

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Filip Sklenář

Mechanismy regulace inhibičního faktoru IF1
Mechanisms of regulation of inhibitory factor IF1

Diplomová práce

Školitel: Ing. Andrea Dlasková, Ph.D.
Garant: doc. RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením Ing. Andree Dlaskové, Ph.D. a uvedl jsem všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval především své školitelce Ing. Andree Dlaskové, Ph.D. za trpělivé a velmi odpovědné vedení mé práce, které bylo pro její zdárné dokončení klíčové. Velké poděkování také patří mé manželce za podporu mého studia, i této práce.

Abstrakt

Inhibiční faktor 1 (IF1) je jedním z hlavních regulátorů aktivity mitochondriální ATP syntázy, klíčového enzymu energetického metabolismu. Jsou známy jeho inhibiční účinky ve stavech jako je například hypoxie, nebo hladovění, avšak nejednotná je doposud hypotéza, zda IF1 inhibuje aktivitu ATP syntázy i za fyziologických podmínek. Poruchy regulace ATP syntázy mohou mít pro buňku fatální následky a byly popsány například u karcinogeneze a ischemie. Rovněž bylo zjištěno, že umlčení genu pro IF1 v pankreatických β -buňkách zvyšuje sekreci inzulínu, a tedy může mít IF1 význam v patogenezi diabetu 2. typu. Cílem této práce je shrnout aktuální poznatky týkající se proteinu IF1 a získat nové výsledky, které pomohou objasnit mechanismus, jakým tento protein reguluje mitochondriální ATP syntázu. Konkrétně se tato práce zabývá poměrem proteinu IF1 vůči ATP syntáze v pankreatických β -buňkách, v závislosti na různých kultivačních podmínkách. Dále zkoumá výskyt post-translačních modifikací proteinu IF1 v pankreatických β -buňkách (modelových buňkách INS-1E), které mohou hrát roli v regulaci aktivity IF1. Rovněž se zabývá poměrem buněčného ATP/ADP, který je jedním z klíčových faktorů pro sekreci inzulínu pankreatickými β -buňkami. Důležitou částí této práce jsou také experimenty na izolovaných jaterních mitochondriích celotělových IF1-knockout myší, při nichž se zkoumá respirace za přítomnosti různých energetických substrátů.

Klíčová slova

IF1, ATP syntáza, post-translační modifikace, PKA, ATP, mitochondrie

Abstract

Inhibitory factor 1 (IF1) is one of the major regulators of mitochondrial ATP synthase activity, a key enzyme of energy metabolism. Its inhibitory effects are known in conditions such as hypoxia or starvation, but the hypothesis that IF1 inhibits ATP synthase activity even under physiological conditions is still not entirely accepted. Disorders of ATP synthase regulation can be fatal to the cell and have been described, for example, in carcinogenesis and ischemia. It has also been found that silencing of the IF1 gene in pancreatic β -cells increases insulin secretion, and thus, IF1 may be important in the pathogenesis of type 2 diabetes. The goal of this work is to summarize the current knowledge about the IF1 protein and to obtain new results that will help elucidate the mechanism by which this protein regulates mitochondrial ATP synthase. Specifically, this work deals with the ratio of IF1 protein to ATP synthase in pancreatic β -cells, depending on different culture conditions. It further investigates the occurrence of post-translational modifications of the IF1 protein in pancreatic β -cells (INS-1E model cells), which may play a role in the regulation of IF1 activity. It also deals with the cellular ATP/ADP ratio, which is one of the key factors for insulin secretion by pancreatic β -cells. An important part of this work are also experiments on isolated liver mitochondria of whole-body IF1-knockout mice, in which respiration is examined in the presence of various energy substrates.

Key words

IF1, ATP synthase, post-translational modifications, PKA, ATP, mitochondria

Seznam zkratk

AA	Akrylamid
ADP	Adenosin difosfát
AKAPs	A-kinázové kotevní proteiny
Akt	Signální transdukční dráha
AMPK	AMP aktivovaná protein kináza
ANT	Adenin nukleotidová translokáza
APS	Persíran amonný
ATP	Adenosin trifosfát
BAD	Proapoptotický protein
BCA	Protokol bicinchoninové kyseliny
Bcl-xL	Antiapoptotický protein
BisAA	N,N'-metylen-bis-akrylamid
BSA	Sérový albumin hovězí
CaM	Kalmodulin
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CCCP	Karbonyl kyanid m-chlorofenyl hydrazon
CFP	Kyanový fluorescenční protein
CHO	Ovariální buňky křečka čínského
COXIV	Mitochondriální cytochrom C oxidáza
db-cAMP	Dibutyryl cyklický adenosin monofosfát
DTT	Dithiotreitol
ECL	Zvýšená chemiluminescence
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
FCCP	Karbonyl kyanid 4-(trifluorometoxy)fenylhydrazon
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
G418	Geneticin
Glc	Glukóza
GLP-1R	Glucagon-like peptid receptor
Glu	Kyselina glutamová
GLUT	Glukózový transporter
Gly	Glycin
H ₂ O	Voda
H49K	Specifická mutace IF1
HeLa	Tkáňová kultura buněk děložního čípku Henriety Lachsové

HEPES	Kyselina 2-[4-(hydroxyethyl)-1-piperaziny]ethansulfonová
hMSC	Lidské mesenchymální kmenové buňky
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-amonio]propan-1-sulfonát
IEF	Izoelektrická fokusace
IER3	Lidský tumorový supresor
IEX-1	Stresem indukovaný myší protein
IF1	Inhibiční faktor 1
IgG	Imunoglobulin G
INS-1E	Inzulinomová buněčná linie pankreatických β -buněk
iPS	Indukované pluripotentní kmenové buňky
K _{ATP}	ATP senzitivní draselný kanál
KO	Knockout
KOH	Hydroxid draselný
LAS	Luminescentní analyzátor
LB	Médium pro bakteriální kultury
LRPPRC	Transkripční faktor
Lys	Lysin
MCU	Mitochondriální jednosměrný transporter
MIM	Vnitřní mitochondriální membrána
MOM	Vnější mitochondriální membrána
mPTP	Mitochondriální permeabilně transientní pór
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
mtDNA	Mitochondriální DNA
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid oxidovaný
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid redukovaný
NF κ B	Jaderná signalizační dráha
Opti-MEM	Médium bez séra
Pak1	p21-aktivovaná kináza 1
PARK2	Cytosolická E3 ubiquitin ligáza Parkin
PBS	Fosfátový pufr
PINK1	Serin-threoninová mitochondriální kináza
PKA	Protein kináza A
PMF	Proton motivní síla
PMSF	Fenylmethylsulfonyl fluorid
PTPMT1	Mitochondriální tyrosin fosfatáza 1

PVDF	Polyvinyliden difluoride
Rho0	HeLa buňky exprimující GFP-PARK2
ROS	Reaktivní formy kyslíku
sAC	Solubilní adenylcykláza
SDS	Dodecylsírnan sodný
Ser	Serin
Sgk-1	Mitochondriální sérum-glukokortikoid indukovaná protein kináza 1
SIRT	Sirtuin
SKIP	Sfingosin kináza
Snai1	Transkripční represor
STBL3	Kompetentní bakteriální buňky (<i>Escherichia coli</i>)
TBB	Transferový pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin
Thr	Threonin
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-fenylenediamin
TTBS	Omývací pufr
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurát
Tyr	Tyrosin
UCP	Odpřahovací protein
UTR	Nepřekládaná oblast DNA
VDAC	Napětově závislý iontový kanál
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
WAVE-1	Wiskott-Aldrich syndrom protein
WT	Divoký druh, běžný typ
YFP	Žlutý fluorescenční protein

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
2.1. MITOCHONDRIE.....	2
2.2. IF1.....	6
2.2.1. Interakce IF1 s ATP syntázou.....	7
2.2.2. Regulace aktivity IF1.....	8
2.2.2.1. OLIGOMERIZACE IF1.....	8
2.2.2.2. FOSFORYLACE IF1 POMOCÍ PROTEIN KINÁZY A.....	10
2.2.3. Regulace množství proteinu IF1.....	13
2.2.4. Exprese IF1 v lidských tkáních.....	14
2.2.5. IF1 stimuluje GLUT4 v buňkách skeletárních svalů.....	15
2.2.6. Úloha IF1 v ischemii.....	17
2.2.7. Regulace mitofagie proteinem IF1.....	17
2.2.8. Změna metabolismu v průběhu rakovinného onemocnění a buněčné diferenciaci.....	18
2.2.9. IF1 a syntéza Hemu.....	21
2.3. PANKREATICKÉ β -BUŇKY LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKU.....	22
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	23
4. MATERIÁL A METODY.....	24
4.1. Materiál.....	24
4.1.1. Použitá tkáňová kultura	24
4.1.2. IF1-KO myši.....	24
4.1.3. Roztoky a chemikálie.....	24
4.1.4. Technické vybavení.....	26
4.1.5. Kultivační nádoby a spotřební materiál.....	28
4.1.6. Použitý software.....	28
4.1.7. Použitá média a pufry.....	29
4.1.8. Seznam protilátek.....	30
4.1.9. Seznam plasmidů.....	30
4.1.10. Seznam použitých komerčních souprav.....	30
4.2. Metody.....	31
4.2.1. Kultivace INS-1E.....	31
4.2.2. Transfekce buněk INS-1E.....	31
4.2.3. Trypsinace a počítání buněk.....	31
4.2.4. Množení plasmidu metodou heat shock.....	31
4.2.5. Příprava INS-1E buněčné linie se zvýšenou expresí proteinu IF1.....	32
4.2.6. Polylysinace mikroskopických skel.....	32
4.2.7. Měření poměru buněčného ATP/ADP pomocí fluorescenční sondy PercevalHR.....	32
4.2.7.1. Příprava tkáňové kultury.....	33
4.2.7.2. Konfokální fluorescenční mikroskopie.....	33
4.2.8. Western blot analýza.....	34
4.2.8.1. Příprava buněčných lyzátů.....	34

4.2.8.2.	Stanovení koncentrace proteinu metodou BCA.....	34
4.2.8.3.	Proteinová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecyl-sulfátem sodným.....	34
4.2.8.4.	Přenos separovaných proteinů na membránu: Western blot.....	36
4.2.8.5.	Inkubace v primární a sekundární protilátce.....	36
4.2.8.6.	ECL detekce a analýza fotografií.....	37
4.2.9.	2D elektroforéza.....	37
4.2.9.1.	Příprava vzorků.....	37
4.2.9.2.	Izoelektrická fokusace.....	37
4.2.9.3.	Ekvilibrační rehydratace stripů.....	37
4.2.9.4.	SDS-PAGE.....	38
4.2.9.5.	Přenos separovaných proteinů na membránu: Western blot.....	38
4.2.9.6.	Inkubace v primární a sekundární protilátce.....	38
4.2.9.7.	ECL detekce a analýza fotografií.....	38
4.2.10.	Měření koncentrace buněčného ATP.....	38
4.2.11.	Izolace jaterních mitochondrií.....	39
4.2.12.	Měření respirace izolovaných jaterních mitochondrií pomocí oxygrafu-2k.....	39
4.2.13.	Statistická analýza.....	40
5.	VÝSLEDKY.....	41
5.1.	STECIOMETRIE IF1 S ATP SYNTÁZOU V PANKREATICKÝCH INS-1E BUŇKÁCH V ZÁVISLOSTI NA OBSAHU GLUKÓZY V MODIFIKOVANÉM KULTIVAČNÍM MÉDIU.....	41
5.2.	POST-TRANSLAČNÍ MODIFIKACE IF1 V PANKREATICKÝCH INS-1E BUŇKÁCH	46
5.3.	ZVÝŠENÁ EXPRESE PROTEINU IF1 SNIŽUJE POMĚR CYTOSOLICKÉHO ATP/ADP	48
5.4.	ÚČINEK GLP-1R AGONISTY NA KONCENTRACI BUNĚČNÉHO ATP V INS-1E BUŇKÁCH SE ZVÝŠENOU EXPRESÍ PROTEINU IF1.....	50
5.5.	IF1 KNOCKOUT SNIŽUJE RESPIRACI IZOLOVANÝCH JATERNÍCH MITOCHONDRIÍ.....	52
6.	DISKUZE.....	61
7.	ZÁVĚR.....	64
8.	LITERATURA.....	65

1. ÚVOD

Jedním z klíčových enzymů v energetickém metabolismu je bezesporu mitochondriální ATP syntáza. Ta sestává ze dvou hlavních částí: membránové (F_0) a matrixové (F_1) domény, celkově se pak skládá z 29 podjednotek (He et al., 2018). Hlavní funkcí tohoto komplexního enzymu je tvorba adenosintrifosfátu, označovaného zkratkou ATP, které může buňka využít v řadě enzymatických procesů. Mimo to se ale ATP syntáza podílí i na samotném formování mitochondriálních krist. ATP syntázové dimery zakřivují vnitřní mitochondriální membránu a organizací do vyšších oligomerů tvoří vrchol mitochondriálních kristy (Strauss et al., 2008). Kromě své role v buněčném dýchání a energetickém metabolismu, hraje ATP syntáza důležitou roli v procesu otevírání mPTP, řízené buněčné smrti.

Kromě své syntetické aktivity může ATP syntáza pracovat i v opačném režimu, ve kterém hydrolyzuje vytvořené buněčné ATP. Taková situace nastává například při hypoxii, nebo srdeční ischemii, kdy dochází k poklesu mezimembránového mitochondriálního potenciálu. Hydrolyzou ATP dochází ke zpětnému pumpování H^+ iontů do mezimembránového prostoru a navyšování pokleslého elektrochemického gradientu. Jedná se však o jev, ohrožující buňku, při kterém může dojít k úplnému vyčerpání ATP a již výše zmíněné buněčné smrti. Na zamezení těchto jevů se zásadně podílí interakční protein IF1, neboli inhibiční faktor 1. Ten se v aktivním stavu váže k matrixové F_1 podjednotce ATP syntázy a blokuje její aktivitu. Dlouho bylo IF1 považováno za inhibitor hydrolytické aktivity ATP syntázy, ale nedávné studie poukazují na jeho inhibiční funkci i v případě syntézy ATP (García-bermúdez and Cuezva, 2016*), což zůstává předmětem diskuze.

Různorodé hladiny IF1 byly diagnostikovány v případě mnoha různých onemocnění, jako například diabetes, nebo rakovinné onemocnění. Dá se tedy předpokládat, že IF1 má zásadní roli v regulaci energetického metabolismu a další studie objasňující mechanismus jeho fungování jsou tedy esenciální.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 MITOCHONDRIE

Mitochondrie řadíme mezi semiautonomní membránové buněčné organely. Mají vnější a vnitřní mitochondriální membránu a v buňce většinou tvoří komplexní rozsáhlé sítě vláken, označované jako mitochondriální retikulum. Vnější membrána je značně pórovitá a spíše se podobá membránám eukaryotických buněk, zatímco membrána vnitřní je svým složením blíže prokaryotickým buňkám a představuje v mitochondriích bariéru pro malé molekuly. Vnitřní mitochondriální membrána navíc utváří výčlipky dovnitř mitochondriální matrix a formuje tak útvary zvané kristy, které zefektivňují metabolické procesy, probíhající uvnitř mitochondrií. Mezi nejdůležitější z těchto procesů patří například buněčná respirace. Mezi další významné metabolické procesy odehrávající se v mitochondriích, patří Krebsův cyklus, β -oxidace mastných kyselin, syntéza hemu, ale i fixace amoniaku v cyklu močoviny. Mimo tyto, se mitochondrie dále významně podílejí na procesech buněčné smrti.

Tvar a velikost mitochondrií není pevně daný. Jedná se o dynamické organely, které neustále podstupující procesy dělení a fúze (*z angličtiny: fusion and fission – Mfn1/Mff*) (Jensen et al., 2000, Scheffler et al., 2008). Mitochondrie komunikují s okolním prostředím díky membránovým kontaktům, známé jsou například kontakty s endoplazmatickým retikulem, takzvané „membrane contact sites“. V jaterních hepatocytech mají mitochondrie „klobásovitý“ tvar, ve fibroblastech pro změnu tvoří protáhlé, „hadovité“ mitochondrie, zatímco například u buněk skeletárního svalu tvoří jakousi prostorovou, dynamickou mřížku (Glancy et al., 2015; Vincent et al., 2019). Velice variabilní je i celkový procentuální objem mitochondrií uvnitř buněk. Například v kardiomyocytech, na které jsou kladeny vysoké energetické nároky, tvoří mitochondrie z celkového objemu buňky ~35%, oproti hepatocytárním ~20% (Page and McCallister, 1973).

Uvnitř mitochondrií se také nachází mitochondriální DNA (mtDNA), díky které řadíme mitochondrie, nebo například i plastidy, mezi již zmíněné semiautonomní organely. Lidská mtDNA je kruhová a obsahuje 37 genů, přičemž kóduje jen 13 proteinů, které se podílejí na oxidativní fosforylaci (Rich

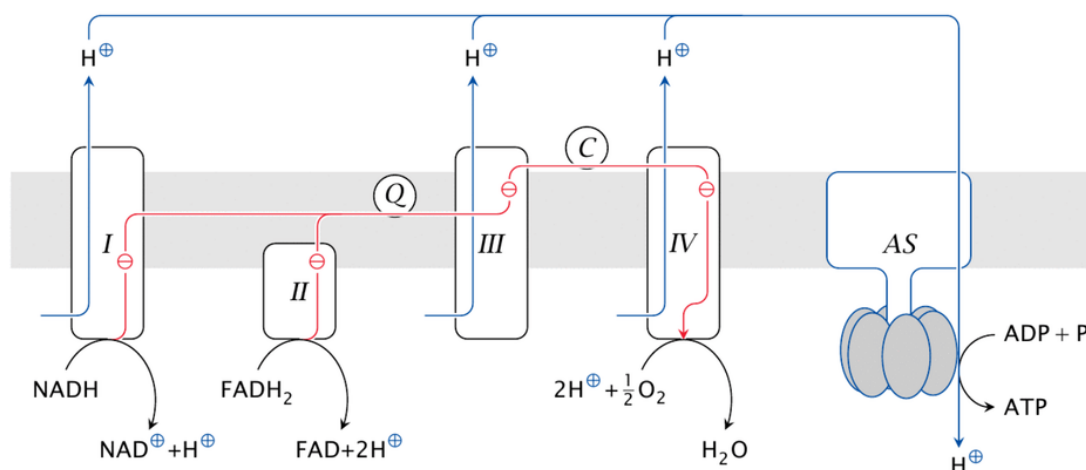
and Maréchal, 2010). mtDNA se nachází v mitochondriální matrix, kde rovněž probíhá genová replikace a genová exprese. Kóduje sedm podjednotek komplexu I dýchacího řetězce, cytochrom b, který je jednou ze tří velkých podjednotek komplexu III dýchacího řetězce; a tři podjednotky komplexu IV dýchacího řetězce (Prasai, 2017*; Rich and Maréchal, 2010). ATP syntáza, neboli komplex V, je celá kódovaná z jaderného genomu, kromě dvou podjednotek: ATP6 a ATP8, které jsou kódované mtDNA (He et al., 2018).

Mitochondrie jsou zároveň jednou z hlavních buněčných zásobáren Ca^{2+} iontů. Přívod Ca^{2+} iontů do mitochondrií je primárně zajišťován prostřednictvím napěťově závislého iontového kanálu VDAC (*voltage dependent anion channel*), který je součástí vnější mitochondriální membrány (mitochondrial outer membrane, MOM), a pomocí mitochondriálního uniporteru MCU ve vnitřní mitochondriální membráně (mitochondrial inner membrane, MIM). Akumulované Ca^{2+} ionty jsou poté z mitochondrií vypuštěny pomocí $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporteru a $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporteru (De Stefani et al., 2016*). Jedna z hlavních rolí intramitochondriálních Ca^{2+} iontů je aktivace enzymů Krebsova cyklu. Zvýšený příliv Ca^{2+} iontů do mitochondrií je rovněž spojován například se svalovou kontrakcí, žláзовou sekrecí, a podobně (Duchen, 2004*). V patologických podmínkách může dojít k mitochondriálnímu Ca^{2+} přetížení a pokud je doprovázeno oxidačním stresem, může způsobit mitochondriální poškození a buněčnou smrt. Tato patologická událost nastává v momentě trvalého otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti (mPTP), který se nachází v MIM, a který je neselektivní a propustný i pro větší molekuly do 1,5 kDa. To má za následek ztrátu elektrochemického gradientu a buněčnou smrt (Duchen, 2004*).

Mitochondrie se mimo jiné podílejí také na degeneraci a celkovému stárnutí organismu, především kvůli produkci reaktivních kyslíkových radikálů z respiračního řetězce. Vzniku reaktivních kyslíkových radikálů lze zabránit pomocí různých mechanismů, jedním z nich jsou například odpřahující membránové proteiny UCP1, UCP2 a UCP3. Určitá míra reaktivních kyslíkových radikálů však může mít na buňku pozitivní mitohormetické účinky, díky nimž se buňka stává odolnější vůči buněčné smrti (Esparza-Moltó and

Cuezva, 2018*; Yun and Finkel, 2014*). Konkrétně mohou aktivovat signalizační dráhu NFκB, která v buněčném jádru spouští expresi důležitých genů pro imunitní odpovědi, buněčný růst, vývoj, nebo buněčnou smrt. Při poškození této dráhy hrozí například přepnutí na rakovinný metabolismus, případně může dojít k různým srdečním onemocněním.

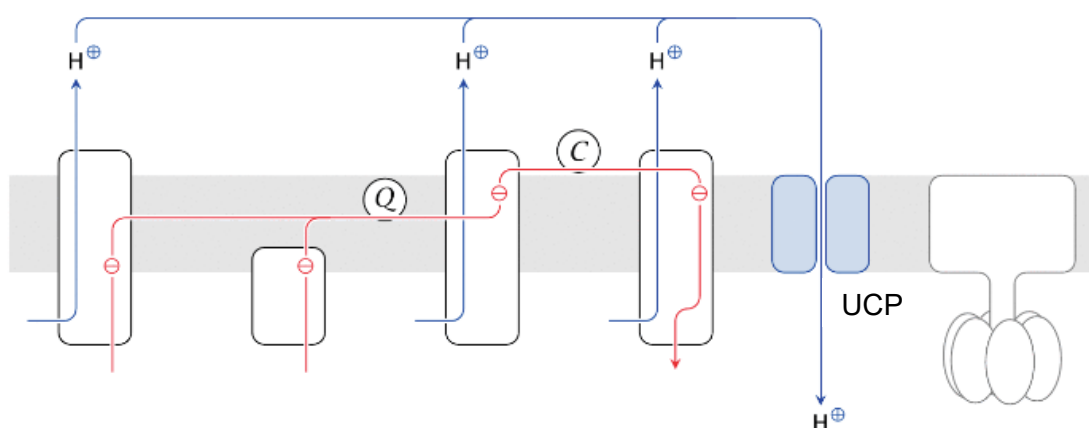
V mezimembránovém prostoru je komplexy dýchacího řetězce utvářen elektrochemický H^+ potenciál. Kvůli zvýšené koncentraci H^+ iontů je zde snížené pH na (6,9); oproti pH v matrix (7,9) (Llopis et al., 1998). Protonový gradient využívá pátý komplex dýchacího řetězce, ATP syntáza, k tvorbě buněčného ATP, díky proton-motivní síle (PMF), jenž vysvětluje chemiosmotická teorie. Jedná se o proces vyrovnávání rozdílu protonového gradientu na membráně, při syntéze buněčného ATP z ADP a P_i (Mitchell, 1961). Proces a uspořádání dýchacího řetězce je znázorněno na *obrázku 1*.



Obrázek 1 – Funkce jednotlivých komponent dýchacího řetězce, tvorba elektrochemického gradientu v mezimembránovém prostoru mitochondrie (nahore). ATP je tvořeno v mitochondriální matrix (dole). *I*: komplex I, *II*: komplex II, *III*: komplex III, *IV*: komplex IV, *AS*: ATP syntáza (StudyLib.net)

Protonový gradient, který je utvářený komplexy dýchacího řetězce do mezimembránového prostoru, může být využit ATP syntázou k tvorbě ATP. Může být také využit například membránovým odpřahujícím proteinem UCP1 (uncoupling protein 1, neboli termogenin). UCP1 nacházíme na vnitřní mitochondriální membráně adipocytů hnědé tukové tkáně, která se typicky vyskytuje u hibernujících živočichů. Při jeho aktivaci mastnými kyselinami

s dlouhým řetězcem funguje UCP1 jako protonový transportér, ruší elektrochemický gradient, čímž mimo jiné stimuluje aktivitu dýchacího řetězce (Fedorenko et al., 2012). Vzniklé teplo je díky oběhovému systému dále distribuováno po celém těle (Jacobsson et al., 1987). Při poklesu teploty okolního prostředí se exprese proteinu UCP1 zvyšuje, což je součástí adaptace organismu na vnější podmínky (Daikoku et al., 2000; Jacobsson et al., 1987). Existují také odpřahující proteiny UCP2 a UCP3, jejichž funkce však není dosud zcela objasněna (Schrauwen et al., 1999). Na *obrázku 2* je znázorněn mechanismus zapojení odpřahovacího proteinu v dýchacím řetězci.



Obrázek 2 – Elektrochemický gradient, tvořený komplexy dýchacího řetězce, může být disipován membránovými odpřahovacími proteiny (UCP). UCP je zde zvýrazněn modře (StudyLib.net).

Elektrochemický gradient také využívá mitochondriální adenin nukleotidová translokáza (ANT), nebo také adenin nukleotidový výměník (Faure Vigny et al., 1996; Brenner and Grimm, 2006*). Jedná se o MIM protein, zajišťující výměnu ADP^{3-} a ATP^{4-} , mezi matrix a mezimembránovým prostorem (Pfaff and Klingenberg, 1968). Dosud není zřejmé, je-li aktivita ANT přímo závislá na asociaci s dalšími partnery, jako je MOM kanál VDAC (voltage-dependent anion channel), fosfátový přenašeč (PiC), ATP syntáza, kreatin kináza, nebo jestli je jeho funkce nezávislá (Brenner et al., 2011*). Jak již bylo zmíněno, jedná se o významný prvek řízení bioenergetického metabolismu. ANT rovněž hraje významnou roli pro adaptaci rakovinných buněk na hypoxii, která se běžně vyskytuje v tumorech (Warburg, 1956; Brenner et al., 2011*).

2.2 IF1

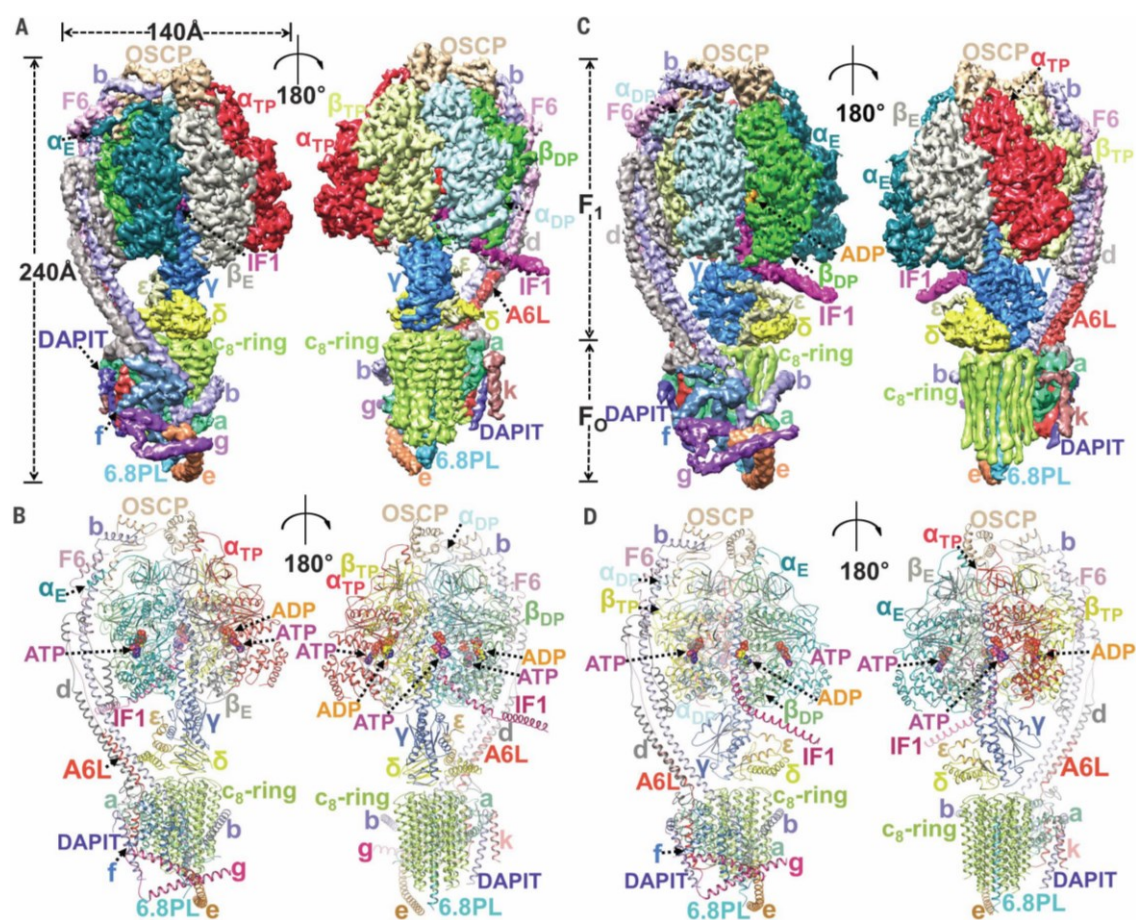
Inhibiční faktor 1 (IF1) je nejčastěji studovaný regulátor ATP syntázy (García-bermúdez and Cuezva, 2016*). Poprvé byl popsán v hovězím srdečním svalu v 60. letech Pullmanem a Monroyem (Pullman and Monroy, 1963). Jedná se o mitochondriální protein kódovaný z ATP1F1 genu, ležícího na 1. chromozomu u lidí a 4. chromozomu u myší. IF1 je malý protein o velikosti 12 kDa, s velice krátkým poločasem rozpadu (~2 hodiny), který je tkáňově specificky exprimován (María Sánchez-Aragó et al., 2013a). Jeho kontrola probíhá zejména na post-transkripční úrovni.

Dosud nesjednocená je hypotéza vazby IF1 k ATP syntáze. Jako první vznikla hypotéza, kdy se IF1 k ATP syntáze váže pouze při poklesu elektrochemického gradientu, tedy například při hypoxii, nebo hladovění, a inhibuje tak její ATP hydrolytickou aktivitu. Tím se zamezí vyčerpání buněčného ATP a případné buněčné smrti. Další z možných hypotéz je, že IF1 se k ATP syntáze váže reverzibilně za fyziologických podmínek a blokuje její syntetickou i hydrolytickou aktivitu (Campanella et al., 2009*; García-bermúdez and Cuezva, 2016*). Této hypotéze mimo jiné nasvědčují i výsledky naší laboratoře (Kahancová et al., 2020, 2018).

Inaktivace IF1 za běžných fyziologických podmínek je zprostředkováno cAMP dependentní protein kinázou A (PKA), pomocí fosforylace na serinu 39 (S39), v závislosti na různých fyziologických podmínkách (García-Bermúdez et al., 2015). Zvýšená exprese proteinu IF1 v buňkách enterocytů, hepatocytů, nebo neuronů, ukázala na zvýšenou inhibici mitochondriální ATP syntázy a zvýšený podíl glykolýzy na produkci ATP. V případě zvýšení elektrochemického gradientu může docházet k produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Tento proces může být podpořen v případě inhibice syntézy ATP proteinem IF1. IF1 také zásadně ovlivňuje uspořádání a supramolekulární organizaci ATP syntázových dimerů na apikálních vrcholech mitochondriálních krist (Strauss et al., 2008).

2.2.1 Interakce IF1 s ATP syntázou

IF1 se k ATP syntáze váže na vazebné místo, nacházející se v katalytickém rozhraní C-konce α a β podjednotek a mechanicky brání rotaci enzymatické γ podjednotky ATP syntázy (García-bermúdez and Cuezva, 2016*; Walker, 2013). N-konec IF1 při této vazbě zároveň interaguje s γ podjednotkou ATP syntázy, v takzvané „super-coiled helix“ konformaci (Cabezón et al., 2003; Gledhill et al., 2007). Fosforylace IF1 na serinu 39 zamezuje navázání IF1 k ATP syntáze a tím zamezuje i jeho inhibiční schopnosti. Na *obrázku 3* je znázorněna struktura ATP syntázy s navázaným proteinem IF1. Jedná se o 3D rekonstrukci z fotografií, pořízených pomocí kryo-elektronové mikroskopie.



Obrázek 3 – Cryo-EM struktura ATP syntázy s proteinem IF1, (A) otevřený stav ATP syntázy při 3,45 Å, bez vazby s nukleotidem (C) uvolněný stav ATP syntázy při 3,34 Å. (B a D) schématická 3D rekonstrukce jednotlivých podjednotek (Gu et al., 2019).

2.2.2 Regulace aktivity IF1

2.2.2.1 OLIGOMERIZACE IF1

Většina studií zdůraznila roli IF1 jako inhibitor hydrolytické aktivity ATP syntázy (Cabezón et al., 2003). Tato situace nastává při mitochondriální depolarizaci, nebo při poklesu pH v mitochondriích (Esparza-Moltó et al., 2017*; García-bermúdez and Cuezva, 2016*). Hodnota pH reguluje náboj histidinů na C-terminálním konci α -helixu proteinu, ovlivňujícího oligomerizaci IF1 (Cabezón et al., 2000). V zásaditém pH tvoří IF1 neaktivní tetramery, znepřístupněním své N-terminální domény (Schnizer et al., 1996). Při sníženém pH (~6) se neaktivní tetramery rozpadnou na aktivní dimery, které se mohou vázat k ATP syntáze (Cabezón et al., 2000). Bylo navrženo, že dimery IF1 by mohly stabilizovat strukturu ATP syntázových oligomerů, čímž by se mohlo zpomalit uvolňování cytochromu c z mitochondrií a zabránit tak buněčné smrti (Campanella et al., 2009). V roce 2019 se povedlo pomocí kryo-elektronové mikroskopie tuto hypotézu potvrdit, po vizualizaci ATP syntázových tetramerů, kdy dva sousední dimery ATP syntázy byly propojeny dimerem IF1, viz *obrázek 4* (Gu et al., 2019)

V souladu s předchozími výsledky byla pozorována větší tvorba ATP syntázových dimerů v myších hepatocytech se zvýšenou expresí proteinu IF1 (s mutací IF1-H49K), což mimo jiné stabilizuje strukturu mitochondriálních krist a chrání buňku před buněčnou smrtí, indukovanou například oxidačním stresem při degradaci acetaminofenu (Santacatterina et al., 2016). Dle této studie však není pro přežití buňky natolik zásadní stabilizace ATP syntázových dimerů a mitochondriálních krist, ale spíše obecné působení mitohormetických účinků zmíněných signalizačních drah. Podporuje to také fakt, že při experimentech na izolovaných mitochondriích myších hepatocytů s narušenou strukturou krist, nebyla nijak ovlivněna retenční kapacita Ca^{2+} iontů v mitochondriích (Santacatterina et al., 2016). Struktura mitochondriálních krist ovlivňuje buněčnou apoptózu (Cogliati et al., 2013).

2.2.2.2 FOSFORYLACE IF1 POMOCÍ PROTEIN KINÁZY A

Protein kináza A je cAMP dependentní kináza vyskytující se u široké řady savců, včetně člověka (Corso and Thomson, 2001; Kleitke et al., 1976; Maria et al., 2006). Protein kináza A je často vázána s komplexy na vnitřní mitochondriální membráně se specifickou regulační podjednotkou $\text{Ri}\beta$ (Ilouz et al., 2012). Mezi substráty protein kinázy A patří komplexy dýchacího řetězce, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter a mnoho dalších mitochondriálních proteinů (Kostic et al., 2015). Je známo, že protein kináza A pomocí fosforylace NADH-dehydrogenázy nebo cytochrom-c-oxidázy reguluje dýchací řetězec (Acin-Perez et al., 2011, 2009). Protein kináza A svojí aktivitou reguluje několik důležitých mitochondriálních funkcí, jako je oxidativní fosforylace, (Dyson et al., 2009), mitochondriální dynamika (fusion/fission) (Cribbs and Strack, 2007; Dickey and Strack, 2011), mitofágie (Dagda et al., 2011; Gomes et al., 2011) a buněčná apoptóza (Dohi et al., 2007). Fosforylací proteinů dýchacího řetězce protein kináza A zvyšuje účinnost dýchacího řetězce (Benedetto et al., 2013; Palorini et al., 2013; Sugawara et al., 2013; Yaniv et al., 2011) a společně s fosforylací a tedy inaktivací IF1 působí jako hlavní regulátor mitochondriální ATP syntetické aktivity (García-Bermúdez et al., 2015). Zdá se však být zřejmé, že protein kináza A potřebuje k fosforylaci IF1 přítomnost některých dalších mitochondriálních proteinů, což vyplývá z neúspěšných pokusů fosforylace IF1 protein kinázou A v podmínkách in vitro (García-Bermúdez et al., 2015). Na buňky HCT116 byly aplikovány různé aktivátory a inhibitory protein kinázy A a jednotlivé izoformy IF1 poté analyzovány pomocí 2D elektroforézy. S aplikací inhibitorů bylo zvýšeno množství defosforylovaného IF1, s pl 8,9. Po kultivaci buněk s membránově propustným aktivátorem protein kinázy A, dibutyryl-cAMP (db-cAMP), bylo však veškeré IF1 fosforylováno (pl 7,6-8,1) (García-Bermúdez et al., 2015).

IF1 může být fosforylován na serinu 39 (S39) a na serinu 63 (S63) (Zhao et al., 2011). Mitochondriální sérum-glukokortikoid indukovaná protein kináza 1 (Sgk-1), která fosforyluje β -podjednotku ATP syntázy, byla identifikována jako interakční partner s IF1, přestože její fosforylační schopnost nebyla in vitro prokázána (O'Keeffe et al., 2013). Na základě in vivo testů bylo popsáno, že IF1

je fosforylován pomocí cAMP dependentní protein kinázy A (PKA) (García-Bermúdez et al., 2015). Bylo prokázáno, že fosforylace proteinu IF1, konkrétně S39, se podílí na inaktivaci proteinu a jeho aktivity, jak bylo dokázáno na fosfodeficientních a fosfomimetických IF1 mutantech (García-Bermúdez et al., 2015)

Skupina proteinů zodpovědných za prostorovou a signální regulaci protein kinázy A, jsou takzvané A-kinázové kotevní proteiny (AKAPs) (Wong et al., 2004*). V pankreatických β -buňkách nacházíme konkrétně WAVE1, gravin, AKAP350 a AKAP79/150 (Wong et al., 2004*). Obecně známe tři kotevní A-kinázové proteiny, které usměřňují protein kinázu A do mitochondrií. První z nich, D-AKAP1 kotví protein kinázu A na vnější straně vnější mitochondriální membrány (Wong et al., 2004*). D-AKAP1 asociuje s ribosomy a proteiny účastníci se transportu do mitochondrií (Carlucci et al., 2008*). Zvýšená exprese proteinu D-AKAP1 v srdečním svalu myší byla provázena snížením oxidativního stresu v kardiomyocytech (Sastri et al., 2013). Další protein ze skupiny WAVE-1, tvoří na vnější mitochondriální membráně komplex s protein kinázou A s apoptotickým proteinem BAD (Danial, et al., 2003). Třetí ze skupiny se nachází na vnitřní mitochondriální membráně. Jedná se o interakční protein se sfingosin kinázou (SKIP), který rovněž směřuje a kotví protein kinázu A do mitochondrií (Means et al., 2011). Aktuálně nelze vyloučit možnost, že by fosforylace IF1 protein kinázou A mohla probíhat i s pomocí zatím neidentifikovaného kotevního proteinu. Obzvláště za hypoxických podmínek, kdy je IF1 defosforylovaný, bylo popsáno významné snížení hladiny D-AKAP1, což by mimo její kotevní funkci mohlo souviset se sníženým transportem protein kinázy A do mitochondrií (García-Bermúdez et al., 2015; Kim et al., 2011).

Důležitým poznatkem je fakt, že fyziologický cyklický adenosin monofosfát (cAMP) neprochází mitochondriální membránou, což znamená, že aktivace protein kinázy A a fosforylace IF1 závisí na zdroji cAMP v mitochondriální matrix (Benedetto et al., 2013; Lefkimmatis and Zaccolo, 2014). Dibutyl-cAMP (db-cAMP), který je membránově propustný, byl použit při experimentech na izolovaných mitochondriích buněk s defosforylovaným IF1. Mitochondrie byly inkubovány s db-cAMP, přičemž došlo k rychlé

fosforylaci IF1 protein kinázou A (García-Bermúdez et al., 2015). Rovněž byly provedeny experimenty na pankreatických β -buňkách, které ukázaly, že db-cAMP aktivuje PKA, a ruší tak efekt zvýšené exprese proteinu IF1 ve vztahu ke koncentraci buněčného ATP (Kahancová et al., 2020). Solubilní adenylylcykláza (sAC), se navíc podílí na regulaci mitochondriální cytochrom C oxidázy (COXIV-I) (Acin-Perez et al., 2011, 2009). Tato adenylylcykláza je aktivována Ca^{2+} ionty a bikarbonátem (Acin-Perez et al., 2009; Benedetto et al., 2013). Noradrenalinovou aktivací transmembránové adenylylcyklázy dojde ke zvýšené produkci mitochondriálního cAMP, která je přímo závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů (Benedetto et al., 2014, 2013). Aktivita protein kinázy A je mimo jiné spojena s aktivací napěťových Ca^{2+} kanálů typu L, což působí zvýšený přísun Ca^{2+} iontů, důležitých v procesech spřažených s výlevem inzulinu pankreatickými β -buňkami, nebo excitací kardiomyocytů (Kamp and Hell, 2000*). Je známo, že mitochondrie sekvestrují intracelulární Ca^{2+} při svalové kontrakci, což podporuje akumulaci Ca^{2+} iontů v mitochondriální matrix a aktivaci sAC (Acin-Perez et al., 2009; Benedetto et al., 2013).

IF1 protein rovněž interaguje s Ca^{2+} vázajícím proteinem calmodulinem (CaM) i jako monomer, přestože se volně vyskytuje pouze jako dimer nebo tetramer. Měření pomocí nativní hmotnostní spektrometrie odhalily, že poměr mitochondriálního IF1:CaM je 1:1 (Pagnozzi et al., 2010). Studie ukazují, že aktivní dimery IF1 jsou v mitochondriích vázány na C-konci CaM proteinu. Aktivita IF1 je tedy nepřímou závislá na signalizaci Ca^{2+} ionty.

Konkrétní fosfatáza defosforylující IF1 nebyla doposud identifikována. Předpokládá se, že by se mohlo jednat například o mitochondriální tyrosin fosfatázu 1 (PTPMT1), která defosforyluje proteiny dýchacího řetězce, jako například sukcinátdehydrogenázu, a jejíž inaktivace má za následek časnou embryonální letalitu, zhoršení syntézy kardiolipinu a změny mitochondriální struktury (Zhang et al., 2011).

Mimo fosforylací jsou známy acetylace, sukcinylace a glykosylace proteinu IF1, avšak není jasné, zda přímo regulují jeho aktivitu. V mitochondriální matrix se na deacetylaci lysinu významně podílí NAD^+ závislá deacetyláza SIRT3, která ovlivňuje takřka všechny procesy probíhající uvnitř

mitochondrií, včetně oxidativní fosforylace (Lombard et al., 2007). Mimo SIRT3 patří do rodiny sirtuinů další dvě deacetylázy, nacházející se v mitochondriích, SIRT4 a SIRT5 (Dvořáková et al., 2013*). Tyto dvě deacetylázy však vykazují nízkou deacetylační aktivitu a nejsou proto příliš významné. Na tkáňové kultuře HeLa buněk byla popsána sukcinylace IF1 na několika zbytcích (Lundby et al., 2012), přičemž se zdá, že funkci desukcinylázy zde zaujímá SIRT5 (Park et al., 2013).

2.2.3 Regulace množství proteinu IF1

IF1 je translatován v různém množství ve všech typech savčích tkání (Faccenda et al., 2017). Vysokou koncentraci nacházíme v tkáních s vysokými energetickými požadavky, tedy například srdce, játra, ledviny, žaludek a mozek. Naopak zanedbatelné bylo jeho množství v plicích, tenkém i tlustém střevu, vaječnicích a mléčné žláze (María Sánchez-Aragó et al., 2013a; Sánchez-Cenizo et al., 2010a). Ovšem v případě rakovinného a nádorového onemocnění byla translace proteinu IF1 vysoká i v těchto výše zmíněných tkáních plic, tenkého a tlustého střeva, vaječnicích a mléčné žlázy (Esparza-Moltó et al., 2017*; M. Sánchez-Aragó et al., 2013; Sánchez-Cenizo et al., 2010a). Kupodivu zvýšené množství proteinu IF1 není spojeno se zvýšenou expresí IF1 mRNA (M. Sánchez-Aragó et al., 2013). Zrovna tak výrazné rozdíly zaznamenané v koncentraci IF1 v lidských mesenchymálních kmenových buňkách (hMSC) a v diferenciovaných osteocytech probíhají beze změn v hladinách IF1 mRNA (María Sánchez-Aragó et al., 2013a). IF1 je protein s velice krátkou životností ~2 hodiny (M. Sánchez-Aragó et al., 2013). I vzhledem k těmto faktům, regulace IF1 je tkáňově specifická a kontrolovaná na post-transkripční úrovni.

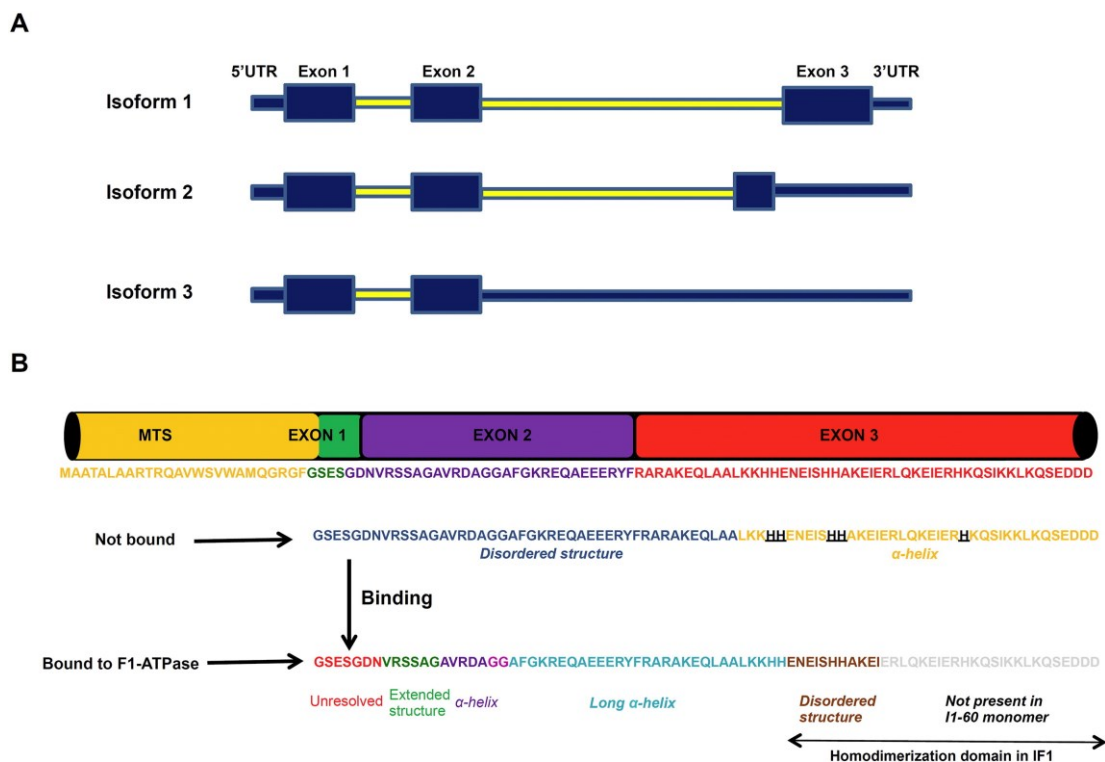
Podle některých studií stresem indukovaný myší protein IEX-1, reguluje v CHO buňkách množství IF1 (Shen et al., 2009). Zvýšená exprese IEX-1, díky zvýšené vazbě k C-konci IF1 vedla ke snížení množství proteinu IF1, označením proteinu IF1 k degradaci zatím neidentifikovanou proteázou (Shen et al., 2009). Nicméně tumorový supresor IER3 (Sebens Mürköster et al., 2008), který je lidským homologem IEX-1, je ve zvýšené míře exprimován v lidských nádorech, které jsou provázeny zvýšenou hladinou IF1 (M. Sánchez-

Aragó et al., 2013). Dále také částečné umlčení genu pro IF1 v lidských rakovinných buňkách tlustého střeva nemělo žádný vliv na hladinu IF1 (M. Sánchez-Aragó et al., 2013). Kontrola hladiny proteinu IF1 může tedy být tkáňově specifická. RNA studie, zaměřené na identifikaci potenciálních proteáz, podílejících se na degradaci proteinu IF1 v lidských buňkách rakoviny tlustého střeva a lidských mesenchymálních kmenových buněk (hMSC), neprokázal žádné konkrétní proteázy (María Sánchez-Aragó et al., 2013a), což naznačuje, že na degradaci a kontrole hladiny proteinu IF1 se podílí komplexní regulační systém.

RNA vázající protein LRPPRC reguluje hladinu proteinu IF1 na posttranskripční úrovni (Sasarmann et al., 2010). Experimenty prováděné na srdcích z LRPPRC *knockout* myši (leucine rich pentatricopeptide repeat containing protein) odhalily zvýšenou expresi IF1, bez relevantních změn v IF1 mRNA. Dále byla také pozorována narušená morfologie mitochondriálních krist a poškozená funkce ATP syntázy, zapříčiněnou defektem v uspořádání tohoto enzymového komplexu (Mourier et al., 2014). Dále bylo také popsáno, že protein IF1 je v tomto experimentálním modelu navázán především na subkomplexech ATP syntázy.

2.2.4 Exprese IF1 v lidských tkáních

Translace proteinu IF1 u lidí probíhá na základě tří sestřihových variant IF1 mRNA (viz *obrázek 5*), které jsou kódovány genem ATP5IF1 (M. Sánchez-Aragó et al., 2013), lokalizovaného na 1. chromozomu. Kvantifikace hladiny mRNA prokázala, že v jaterní, srdeční a ledvinové tkáni, je hlavní sestřihovou variantou 12,24 kDa dlouhá izoforma IF1 s pI 9,34 (M. Sánchez-Aragó et al., 2013). Tvořena je třemi exony, obsahující malé 3'UTR (García-bermúdez and Cuezva, 2016*). Isoforma 2; o velikosti 7,91 kDa a pI 7,96; rovněž obsahuje tři exony, přičemž poslední z nich je menší s odlišnou C-terminální sekvencí oproti první izoformě. Nejmenší izoforma 3 o velikosti 6,59 kDa a pI 8,34; je translatována do nejkratší izoformy IF1. Obsahuje pouze dva exony a dlouhý 3'UTR. Jednotlivé izoformy jsou znázorněny na *obrázku 5*.

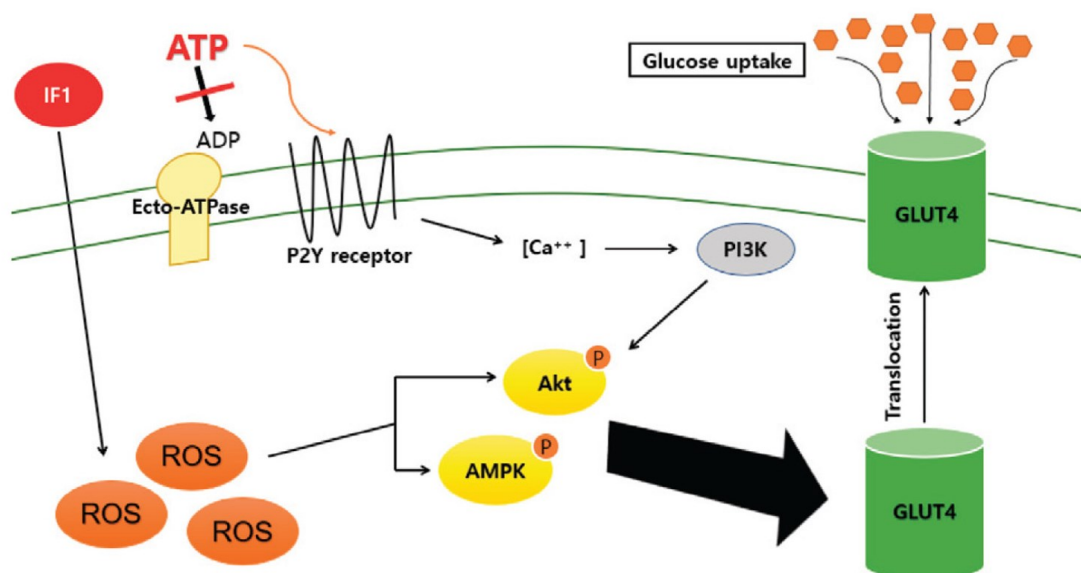


Obrázek 5 – (A) Jednotlivé izoformy IF1 mRNA. Izoforma 1 je 12,24 kDa dlouhá a obsahuje tři exony. Izoforma 2 je 7,91 kDa dlouhá a obsahuje rovněž tři exony. Izoforma 3 je 6,59 kDa dlouhá a obsahuje pouze dva exony. (B) aminokyselinová sekvence IF1 proteinu a jeho sekundární struktura ve volné i navázané formě (García-bermúdez and Cuezva, 2016*)

2.2.5 IF1 stimuluje GLUT4 v buňkách skeletárních svalů

Pro příjem glukózy do buněk je obecně klíčový inzulin, který vede k translokaci glukózového transportéru 4 (GLUT4). V případě skeletárních svalů je absorpce zesílena i pomocí fosforylace AMPK, nebo ATP-dependentní aktivací PI3 kinázy a následnou fosforylací Akt dráhy. Podle nedávné studie se zdá, že IF1 stimuluje zvýšení fosforylace AMPK tím, že zvyšuje produkci ROS v respiračním řetězci inhibicí syntetické aktivity ATP syntázy, což ve výsledku vede ke zvýšenému přísunu glukózy do cytoplazmy v buňkách skeletárního svalu a v primární kultuře myoblastů. (Lee et al., 2019). Fosforylace AMPK zvyšuje translokaci a aktivuje GLUT4. V případě kosterních svalů se jedná o kontrakci indukovanou absorpci glukózy do myoblastů (Jensen et al., 2009). Extracelulární ATP stimuluje PI3 kinázu, která poté fosforyluje Akt, což opět

vede k translokaci GLUT4 (Lee et al., 2019). Je rovněž známo, že malé GTPázy 1 z rodiny Rac1, se podílejí na zvyšování příjmu glukózy do buněk. Po přidání rekombinantního IF1 k buňkám docházelo ke zvýšení fosforylace p21-aktivované kinázy 1 (Pak1), Rac1 a AMPK. Na *obrázku 6* jsou schématicky znázorněné procesy aktivace GLUT4.



Obrázek 6 – IF1 stimuluje glukózový transportér 4, podpořením procesů fosforylace AMPK, což vede k aktivaci glukózového transportéru (Lee et al., 2019)

Podávání rekombinantního IF1 snížilo u diabetických zvířecích modelů hladinu glukózy v krvi a zlepšilo glukózovou toleranci. V posledních desetiletích se v populaci významně rozšířil výskyt cukrovky 2. typu. Výsledky této studie rovněž nasvědčují, že stimuly pohybových aktivit zvyšují expresi proteinu IF1, a jeho uvolnění ze svalových buněk. Proto tato studie navrhuje protein IF1 jako nový myokin a potenciální antidiabetikum (Lee et al., 2019). Je známo, že pravidelné fyzické cvičení převážně aerobního charakteru funguje jako účinná prevence proti rozvoji tohoto onemocnění. Ačkoliv nejsou dosud jasné mechanismy, podle některých analytických studií snižuje aerobní cvičení hladinu krevní glukózy na lačno až o 0,15 mM, mimo další komponenty metabolického syndromu, jako je například snížení krevního tlaku, nebo profil krevních lipidů (Wewege et al., 2018*).

2.2.6 Úloha IF1 v ischemii

Úloha proteinu IF1 v případě ischemie byla v minulosti zkoumána, přičemž poškození spojené s ischemií bylo spojováno s vyčerpáním hladin ATP. Již zmíněnou funkcí proteinu IF1 je mimo jiné inhibice hydrolytické aktivity ATP syntázy, při které zmíněný enzym hydrolyzuje mitochondriální ATP. V této situaci nastává i obrat chodu adenin-nukleotidového translokátoru, přičemž se z mitochondrií stanou spotřebitelé ATP, namísto jinak fyziologických producentů ATP (Metelkin et al., 2006). Inhibicí hydrolytické aktivity tak IF1 zabrání úplnému vyčerpání ATP, jak bylo ukázáno na myších modelech se zvýšenou expresí proteinu IF1, a rovněž na *IF1 knockout* myších (Campanella et al., 2008).

V souladu s těmito zjištěními má v srdečním svalu protein IF1 protektivní roli, přičemž zabraňuje buněčnému poškození a buněčné smrti (Rouslin et al., 1990). Mimo jiné se diskutuje, že mezi různými druhy organismů je citlivost k srdeční ischemii spojena s expresí a vazebnou afinitou IF1 (Rouslin and Broge, 1992).

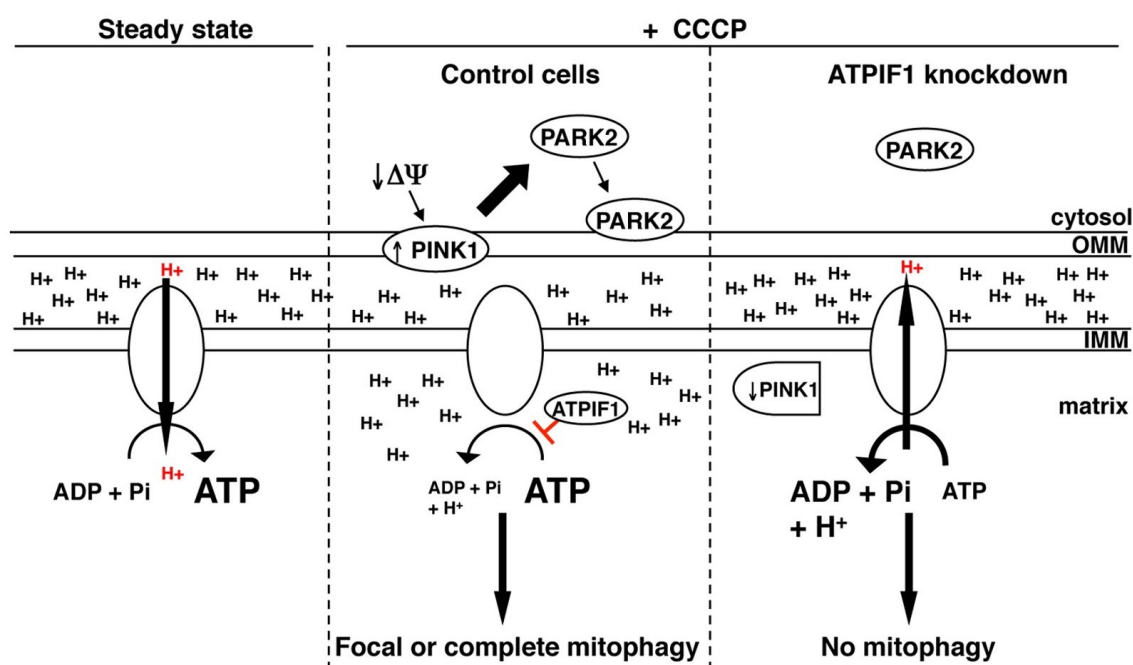
2.2.7 Regulace mitofagie proteinem IF1

Inhibice aktivity reverzního chodu ATP syntázy ovlivní jak množství buněčného ATP, tak elektrochemický H^+ potenciál. Z experimentálních výsledků na HeLa buňkách je zřejmé, že za hypoxického stavu měly buňky se zvýšenou expresí IF1, snížený membránový H^+ potenciál, oproti buňkám s umlčeným genem pro IF1 (Campanella et al., 2008). Snížení exprese proteinu IF1 by v tomto ohledu mohlo mít terapeutické využití v patologických situacích, zahrnujících dysfunkce dýchacího řetězce, jak se ukázalo například u pacientů s myopatiemi, nebo neuronální ceroidní lipofuscinózou (Santacatterina et al., 2015).

Jedním ze znaků zdravé buňky je mitochondriální membránový potenciál. Depolarizace membránového potenciálu vyvolává mitofagii, lysozomální degradaci buněčných organel (Youle and Narendra, 2011).

Mitofagii regulují dva hlavní proteiny: protein vnější mitochondriální membrány PINK1 a cytosolická E3 ubiquitin ligáza Parkin (PARK2).

PINK1 je serin-threoninová kináza, akumulující se specificky ve vnější membráně (MOM) depolarizované mitochondrie. Její akumulaci na membráně dochází k interakci s ligázami PARK2, což zvyšuje množství ubiquitínovaných proteinů podporujících mitofágii (Koyano et al., 2014). Při experimentech na Rho0 buňkách (HeLa buňky exprimující GFP-PARK2), postrádajících mitochondriální DNA, bylo při použití CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine), odpřahovače membránového potenciálu vyzorováno, že buňky s delecí genu pro IF1 podstatně lépe udržují membránový potenciál, což brání akumulaci PINK1 a PARK2, jinak vedoucích k mitofágii, viz *obrázek 7* (Lefebvre et al., 2013).



Obrázek 7 – IF1 v Rho0 buňkách brání hydrolýze ATP, přičemž dochází ke kumulování MOM proteinu PINK1 a cytosolické ligázy PARK2, vedoucí až k mitofágii (Lefebvre et al., 2013).

2.2.8 Změna metabolismu v průběhu rakovinného onemocnění a buněčné diferenciaci

Lidské tkáně mají různý obsah a poměr proteinu IF1, jak již bylo v této práci zmíněno. Tkáně s vysokou energetickou náročností, jako jsou: ledviny, srdce a

mozek, obsahují nejvyšší množství proteinu IF1 (M. Sánchez-Aragó et al., 2013; Sánchez-Cenizo et al., 2010b). Tento jev byl studován *in vivo* na myších kardiomyocytech, kde bylo popsáno, že určitá frakce IF1 se v buňkách nachází ve fosforylovaném, neaktivním stavu, zatímco jiná frakce fosforylována není a je a tedy inhibičně aktivní. Neaktivní frakce IF1 zřejmě přispívá k flexibilitě v odezvě na nestálé energetické nároky (García-Bermúdez et al., 2015).

Pro buňky rakovinného metabolismu je typický útlum, nebo snížení kapacity dýchacího řetězce a posílení aerobní glykolýzy, jakožto hlavní metabolické dráhy k vytváření buněčného ATP (Warburg, 1956). Biochemické dráhy aerobní glykolýzy dodávají rakovinným buňkám anabolické meziprodukty, potřebné k růstu a proliferaci buněk (Cuezva et al., 2009*; María Sánchez-Aragó et al., 2013a; Vander Heiden et al., 2009*). Tyto anabolické meziprodukty aerobní glykolýzy jsou obzvláště důležité například v embryonálních tkáních a nediferencovaných pluripotentních kmenových buňkách (Cuezva et al., 2007; Lunt and Vander Heiden, 2011*). Jedním z důvodů upřednostnění glykolytického metabolismu před dýchacím řetězcem je nadměrná produkce IF1 v rakovinných buňkách. Jak už jsem zmínil v předchozích kapitolách této práce, v karcinomech prsu, plic, vaječníků a tlustého střeva, bylo zaznamenáno významné zvýšení exprese proteinu IF1, oproti běžnému fyziologickému stavu těchto tkání (M. Sánchez-Aragó et al., 2013; Sánchez-Cenizo et al., 2010a). Zvýšený obsah proteinu IF1 má v mitochondriích za následek snížení mitochondriální syntézy ATP a současně s tím posílení aerobní glykolýzy, jak v rakovinných buňkách, tak v neuronech a hepatocytech (Formentini et al., 2014; Sánchez-Cenizo et al., 2010a; Santacatterina et al., 2016). Silencing IF1 tedy vyvolává fenotyp se sníženou aerobní glykolýzou a posílenou dráhou dýchacího řetězce (Sánchez-Cenizo et al., 2010a). Akumulovaný IF1 v buňkách karcinomu prsu, plic a tlustého střeva, se nachází v aktivním defosforylovaném stavu (García-Bermúdez et al., 2015). Když IF1 začne inhibovat dýchací řetězec, dojde k aktivaci stresových drah AMPK kinázy, sloužících k překonání dočasné stresové situace a nedostatku ATP (Formentini et al., 2014; Santacatterina et al., 2016).

V důsledku inhibiční aktivity IF1 na syntézu ATP začne docházet k mitochondriální hyperpolarizaci, kvůli omezení zpětného toku H^+ iontů do mitochondriální matrix. To má za následek zvýšenou produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) (Formentini et al., 2012; M. Sánchez-Aragó et al., 2013; Santamaría et al., 2006). Produkce ROS aktivuje jadernou signalizaci, která působí adaptaci na zvýšený oxidační stres. Tento proces retrogradní signalizace se obecně nazývá mitohormese (Yun and Finkel, 2014*). Zde se IF1 uplatňuje v aktivaci signalizační dráhy NFκB, která podporuje buněčnou proliferaci a Bcl-xL ochranu před buněčnou smrtí v neuronech a v rakovinových buňkách (M. Sánchez-Aragó et al., 2013). Zvýšená exprese proteinu IF1 v myších hepatocytech indukuje jadernou signalizaci Nrf2, která má pozitivní vliv na lepší odolnost jater vůči krátkodobým oxidačním stresům při odbourávání léčiv, jako je například acetaminofen (Santacatterina et al., 2016). Jak jsem již naznačoval výše, tento druh signalizace je v souvislosti s rakovinou jater škodlivý. Při degradaci širokého spektra systémových látek je nadměrná exprese proteinu IF1 v játrech spíše proonkogenního charakteru, v důsledku zvýšeného rizika vzniku genetických lézí (Santacatterina et al., 2016). Toto platí i pro nádorové tkáně žaludku, močového měchýře a gliomu (Ding et al., 2018; Ruipeng et al., 2014). Konkrétně u rakoviny jater podporuje IF1 metastáze a angiogenezi přes NFκB dráhu a Snai1 transkripční represor, což má za následek epiteliální mezenchymální diferenciaci. Angiogeneze probíhá prostřednictvím růstového faktoru VEGF (RuiPeng et al., 2014). V případě rakoviny žaludku a tlustého střeva spočívá onkogenní role IF1 především ve zvýšené rezistenci vůči buněčné smrti, a to prostřednictvím ROS indukované signalizační dráhy NFκB (Formentini et al., 2012). Onkogenní role IF1 v případě močového měchýře se zdá být především závislá na zvýšení aktivity cyklinů a cyklin-dependentních kináz, zabezpečujících přechod z buněčné růstové fáze G1 do S fáze (Wei et al., 2015). Kupodivu však není vždy zvýšená exprese IF1 proteinu v nádorech špatnou prognózou. Například u nádoru prsu, nebo tlustého střeva, mají pacienti lepší prognózu, než ti s nižší hladinou (Esparza-Moltó and Cuezva, 2018*). Rozdíl je pravděpodobně ve schopnostech metastatické migrace, ke které jsou zapotřebí vyšší koncentrace buněčného

ATP, a proto může zvýšená koncentrace IF1 proteinu, omezením aktivity ATP syntázy, omezovat metastatické migrace.

Jedním ze zásadních rozdílů mezi diferencovanými, nediferencovanými a rakovinnými buňkami, je v jejich metabolickém nastavení. Diferencované buňky mnohem více k tvorbě ATP upřednostňují dráhy dýchacího řetězce a naopak nediferencované, nebo rakovinné buňky primárně fungují pomocí aerobní glykolýzy (Chen et al., 2008; Tormos et al., 2011). Přeprogramování somatických buněk na indukované pluripotentní kmenové buňky (iPS) provází utlumení dýchacího řetězce a posílení aerobní glykolýzy (Folmes et al., 2011). V tomto procesu pravděpodobně hraje významnou roli IF1, v případě inhibice ATP syntázy a utlumení mitochondriální produkce ATP. Tento jev lze pozorovat u lidských mesenchymálních kmenových buněk (hMSC), v případě udržení klidového, nediferencovaného stavu. Umlčení genu pro IF1 v hMSC podporuje diferenciaci a zapojení drah dýchacího řetězce (María Sánchez-Aragó et al., 2013b).

2.2.9 IF1 a syntéza Hemu

IF1 je rovněž nezbytný pro syntézu hemu, jak ukazují studie na lidských buněčných liniích (například na progenitorových buňkách) a také Dániu pruhovaném (Shah et al., 2012). Při deleci genu pro IF1 dochází ke zvýšení pH v mitochondriální matrix, což negativně ovlivňuje aktivitu mitochondriální ferrochelátázy, katalyzující inzerci Fe^{2+} do protoporfirinového IX kruhu. To vede k anémickému fenotypu, jak bylo ilustrováno na Dániu pruhovaném (Shah et al., 2012).

2.3 PANKREATICKÉ β -BUŇKY LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKU

Jedním z nejdůležitějších fyziologických hormonů celkového energetického metabolismu je inzulin. Jedná se o peptidický hormon, skládající se z celkem 51 aminokyselin, produkovaný pankreatickými β -buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Jeho funkcí je signalizace pro absorpci krevní glukózy buňkami periferních tkání. Nezanedbatelnou roli při sekreci inzulinu z β -buněk Langerhansových ostrůvků zde hrají mitochondrie. Buněčné ATP obecně funguje jako důležitý produkt katabolismu glukózy, stimulující uvolňování inzulinu. Tomuto jevu se říká glukózou stimulovaná sekrece inzulinu. Poměr buněčného ATP/ADP hraje v tomto jevu klíčovou roli, prostřednictvím ATP-senzitivních draslíkových kanálů, označovaných zkratkou K_{ATP} . Uzavřením K_{ATP} kanálů dojde k depolarizaci buněčné membrány a k aktivaci napěťově řízených Ca^{2+} kanálů typu L. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} stimuluje exocytózu inzulinových granulí do tělního oběhu. Již zmíněný IF1, tím že inhibuje aktivitu ATP syntázy, působí jako negativní regulátor sekrece inzulinu, jak bylo potvrzeno experimenty naší laboratoře (Kahancová et al., 2018).

3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo popsat molekulární mechanismy regulující funkci inhibičního faktoru 1 (IF1). Konkrétně byly studovány:

- Změny v expresi proteinu IF1 pankreatických β -buněk, vzhledem k dostupnosti substrátu v kultivačním médiu.
- Výskyt post-translačních modifikací proteinu IF1 v pankreatických β -bunčkách.
- Rozdíly v poměru ATP/ADP u INS-1E buněk se zvýšenou expresí proteinu IF1.
- Účinky GLP-1R agonisty na koncentraci buněčného ATP v případě INS-1E linie se zvýšenou expresí proteinu IF1.
- Rozdíly mitochondriální aktivity dýchacího řetězce na izolovaných jaterních mitochondriích celotělových *IF1 knockout* myší.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Použitá tkáňová kultura

Pro většinu experimentů byly použity buňky tkáňové kultury INS-1E. Buněčná linie INS-1 z roku 1992 byla izolována z potkaního inzulinomu (Asfari et al., 1992). Tkáňová kultura INS-1 vykazuje mnoho důležitých, fyziologických charakteristik pankreatických β -buněk, jako je vysoká produkce inzulinu a glukózová senzibilita. Přestože syntetizují proinzulin I i II, jejich produkce inzulinu odpovídá asi 20% nativních β -buněk (Asfari et al., 1992). Izolované klonální buňky INS-1E vykazují stabilní diferencovaný fenotyp β -buněk, se schopností vylučování inzulinu v reakci na koncentraci glukózy, s podobnou křivkou závislosti výlevu inzulinu na koncentraci glukózy, jako u primárních β -buněk z Langerhansových ostrůvků (Merglen et al., 2004).

4.1.2 *IF1 knockout* myši

Pro účely měření na izolovaných jaterních mitochondriích byly použity *IF1 knockout* (IF-KO) myši, konkrétně C57/BL6J (*Atpif1*^{-/-}) a *wild type* myši, konkrétně C57 BL/6 (WT) (Nakamura et al., 2013). Myši byly chované při 22°C, při běžném cyklu světlo/tma (12h/12h), a měly volný přístup k potravě a pitné vodě. K experimentům byli použiti samci staří 12-16 týdnů, v souladu s mezinárodní a Evropskou legislativou (86/609/EEC).

4.1.3 Roztoky a chemikálie

2-merkaptoethanol, Sigma-Aldrich, USA

3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-amonio]propan-1-sulfonát (CHAPS), Sigma-Aldrich, USA

ADP (Adenosine 5'-diphosphate sodium salt), Sigma-Aldrich

Akrylamid, Sigma-Aldrich, USA

Antimycin A (*Streptomyces* sp.), Sigma-Aldrich, USA

Bicinchoninová kyselina (Pierce BCA protein assay reagent A), Thermo Fischer Scientific, USA

Bromfenolová modř, Sigma-Aldrich, USA

Chlorid amonný, Lachema, ČR
Chlorid draselný, Sigma-Aldrich, USA
Chlorid sodný, Lachema, ČR
Chlorid vápenatý, Sigma-Aldrich, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), Serva, Německo
DeStreak solution, GE Healthcare, Velká Británie
Dithiotreitol (DTT), Thermo Fischer Scientific, USA
Dodecylsírán sodný (SDS), Sigma-Aldrich, USA
Ethanol, Lachner, ČR
Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), Sigma-Aldrich, USA
Fetální hovězí sérum, BioSera, Francie
Formaldehyd, Lachner, ČR
Geneticin, G418, Roche, Německo
GLP-1R, glucagon-like peptide-1 receptor, G8048, Sigma-Aldrich, USA
Glukosa 1 M, Institut molekulární genetiky, ČR
Glutamát, Sigma-Aldrich, USA
Glycerol, Sigma-Aldrich, USA
Glycin, Sigma-Aldrich, USA
Hydroxid sodný, Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenuhličitan sodný, Lachema, ČR
IPG pufr, GE Healthcare, Velká Británie
Iodoacetamid, Serva, Německo
Isopropylalkohol, Lachner, ČR
Kanamycin sulfát, Sigma-Aldrich, USA
Karbonyl kyanid 4-(trifluoromethoxy)fenylhydrazon (FCCP), Sigma-Aldrich, USA
Kvasnicový extrakt, Lachema, ČR
Kyselina 2-[4-(hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonová (HEPES), Sigma-Aldrich, USA
Kyselina chlorovodíková, Penta, ČR
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma-Aldrich, USA
Kyselina octová, Lachner, ČR
Lipofectamine™ 2000, ThermoFisher Scientific, USA

Luminata Forte, Western HRP Substrate Millipore Corporation, Billerica, USA
Malát, Sigma-Aldrich, USA
Methanol, VWR, Francie
Minerální olej, DryStrip Cover Fluid GE Healthcare, Velká Británie
Močovina, GE Healthcare, Velká Británie
N,N'-methylen-bis-akrylamid (BisAA), Sigma-Aldrich, USA
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-fenylenediamin (TMPD), Sigma-Aldrich, USA
N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED), Bio-Rad, USA
Nonidet P-40, Sigma-Aldrich, USA
Oligomycin-A, Tocris, Velká Británie
Percoll, Sigma-Aldrich, USA
Persíran amonný (APS), Sigma-Aldrich, USA
Precision Plus Protein Kaleidoscope, Bio-Rad, USA
Pyruvát, Sigma-Aldrich, USA
Rotenon, Sigma-Aldrich, USA
Sérový albumin hovězí (BSA), Sigma-Aldrich, USA
Sérový albumin hovězí, bez mastných kyselin (BSA), Sigma-Aldrich, USA
Síran měďnatý, Thermo Fischer Scientific, USA
Sukcinát sodný, Sigma-Aldrich, USA
Thiosíran sodný (pentahydrát), Chemapol, ČR
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Sigma-Aldrich, USA
Triton X-100, Sigma-Aldrich, USA
Trypanová modř 0,4% (m/V) v 0,81% (m/V) chloridu sodném a 0,06% (m/V) fosforečnanu draselném, BioRad, USA
Trypton, Lachema, ČR
Tween 20 (polyoxyethylensorbitanmonolaurát), Sigma-Aldrich, USA

4.1.4 Technické vybavení

Analytická váha, Mettler Toledo AG204
Autokláv, Tuttnauer 2540EL
Automatická pipeta eppendorf Research, Research Plus
Automatická pipeta GILSON PIPETMAN
Automatická počítáčka buněk, Countess automated cell counter, invitrogen

Blotovací aparatura BIO-RAD Criterion TM Blotter 560BR 17330
Centrifuga eppendorf 5417R
Centrifuga eppendorf 5427R
Centrifuga Sigma 3-18K Sartorius
Centrifuga Sigma 2K15
Centrifuga Combi-spin FVL-2400N biosan
CO₂ inkubátor INNOVA CO-170
Destičkový spektrofotometr Synergy HT, BioTek, SN: 208928
Elektroforetická aparatura BIORAD Mini-Protean 3 Cell, SN: 67S/22779
Elektroforetická skla BIORAD 1,5 mm
Elektroforetický zdroj Labnet, ENDURO Power Supplies E0203, SN:091009008
Elektroforetický zdroj Labnet, ENDURO Power Supplies mini E0304, SN:130401213
Ettan IPGphor II, GE Healthcare
Fluorescenční konfokální mikroskop, Leica TCS SP8
Kývačka, Grant Boekel BFR25
Laminární box, HERA safe
Laminární box, SafeFast classic
Laminární box, ThermoScientific - MSC Advantage
Lázeň ohřívací, bulabo SW22
LAS-1000, luminescentní analyzátor, Fujifilm
Magnetická míchačka, Scilogex
Magnetická míchačka s ohřevem, IKA RH basic 2
Minicentrifuga, Combi-Spin FVL-2400N biosan
Minispin, eppendorf mini spin
Optický mikroskop, Leica 520804
pH metr, ThermoScientific, OrionStar A111
Pipetovací nástavce 10 ml, eppendorf Research Plus
Rotační mixér, Stuart roller mixer Srt6
Spektrofotometr, eppendorf BisPhotometer
Termobloček, BIOER Mixing Block MB-102
Třepací inkubátor, innova 4300, New Brunswick Scientific

Třepací shaker, elpan laboratory shaker type 358S
 Váha laboratorní, AND HL-200
 Vortex, Tehnica vibromix 114
 Vortex minishaker, P-LAB Vortex-mixer
 Vortex, Labnet VX100
 Výrobník destilované vody, společnosti GORO
 Výrobník ledu, ICE MAKERS – Ice Flaker, BREMA
 Oxygraph-2k, super-rezoluční respirometr - Oroboros
 Sonikátor, Kraintek 3
 -80°C mrazák, Thermo Scientific Forma 905

4.1.5 Kultivační nádoby a spotřební materiál

Immobiline DryStrip pH 6-11, 7 cm, 18 cm, GE Healthcare, Švédsko
 Kultivační devadesátíšestijamka (96WP); $0,34\text{ cm}^2$; Z707902, TPP, Švýcarsko
 Kultivační šestijamka (6WP); $9,026\text{ cm}^2$; 734-2323, VWR, Francie
 Kultivační lahve $182,5\text{ cm}^2$, 734-2315, VWR, Francie
 Kultivační misky $22,1\text{ cm}^2$, 93060, TPP, Švýcarsko
 Nitrilové rukavice, Halyard, USA
 Parafilm "M" Bemis, Sigma-Aldrich, USA
 Pipetovací špičky $10\text{-}1000\text{ }\mu\text{l}$, ClearLine, Biotech, Itálie
 Pipetovací špičky 10 ml , eppendorf Biopur, eppendorf, ČR
 Plastové zkumavky $1,5\text{ ml}$, Axygen, USA
 PVDF blotovací membrána, BIORAD Immun-Blot PVDF Membranes for protein blotting, 1620177, Sigma-Aldrich, USA

4.1.6 Použitý software

GraphPad	Graphpad Holdings, LLC, USA
ImageJ	Wayne Rasband, USA
Leica LAS AF	Leica, Německo
Microsoft Excel	Microsoft, USA
Microsoft Word	Microsoft, USA
SigmaPlot 9.0	Systat Software, USA

4.1.7 Použitá média a pufr

Agarózové kultivační misky - 1% (m/V) trypton; 0,5% (m/V) kvasnicový extrakt (yeast extract); 1% (m/V) NaCl; 1,5% agar (m/V)

ATP pufr – EDTA pufr (100 mM Tris; 4 mM EDTA; pH 7,75)

Ekvilibrační pufr – 6 M močovina; 50 mM Tris-HCl; pH 6,8; 30% (V/V) glycerol; 2% (m/V) SDS

Elektrodotový pufr - 0,025 M Tris; 0,2 M glycin; 0,1 % (m/V) SDS; pH 8,3

Fosfátový pufr – PBS (phosphate buffered saline); 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 8 mM Na_2PO_4 ; pH 7,2; Institut molekulární genetiky, ČR

Kultivační médium pro INS-1E - RPMI 1640 médium s 11 mM glukózou, 1 mM pyruvát, 2 mM L-glutaminem, 10 mM HEPES, 5% (V/V) hovězím fetálním sérem, 50 μM β -mercaptoethanolu, 50 IU/ml penicilinu, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinu, Institut molekulární genetiky, ČR

LB médium - 1% (m/V) trypton; 0,5% (m/V) kvasnicový extrakt (yeast extract); 1% (m/V) NaCl

Lyzační pufr – 50 mM HEPES; 135 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% (V/V) Triton X-100; 1 mM PMSF; pH 7,4

Modifikované RPMI médium (měřicí médium) - 10 mM HEPES, 2 g/l bikarbonát sodný, 2,5% (V/V) fetální hovězí sérum, 50 μM β -merkaptoethanol, 50 IU/ml penicilin, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin v RPMI 1640

Omývací pufr (TTBS) - 20 mM Tris; 0,5 M NaCl; 0,05% (V/V) Tween 20

Opti-MEM – kultivační médium s redukováným obsahem séra, Biogen-EMS, ČR

Pufr pro ředění primárních protilátek - 1% (m/V) BSA; 0,1% (m/V) želatina z kostnatých ryb; 0,5% (V/V) Triton X-100; 0,05% (V/V) azid sodný v roztoku PBS (pH 7,3)

Respirační médium – 135 mM NaCl; 3,6 mM KCl; 10 mM HEPES; 0,5 mM MgCl_2 ; 1,5 mM CaCl_2 ; 500 nM NaH_2PO_4 ; 0,1% (m/V) BSA bez mastných kyselin; pH 7,4

Sacharózové médium – 220 mM D-manitol; 70 mM sacharóza; 1 mM HEPES; 1 mM EGTA; BSA (5 mg/ml)

Transferový pufr elektroblotovací (TBB) – 25 mM Tris; 192 mM glycine; 0,01% (m/V) SDS; 20% (V/V) methanol

Trypsin - 160 mg/l EDTA; 250 mg/l trypsin; 100 ml PBS

Vzorkový pufr (Sample buffer, 5xSB) - 0,002% (m/V) bromfenolová modř, dodecylsírán sodný (SDS), 15% (V/V) glycerol, 50mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan

4.1.8 Seznam protilátek

Primární protilátka proti α -podjednotce ATP syntázy (ab14748), Abcam, Velká Británie

Primární protilátka proti IF1 (ab110277), Abcam, Velká Británie

Sekundární protilátka Goat-Anti-Mouse IgG (A-3562), Sigma, USA

4.1.9 Seznam plasmidů

Plasmid pro expresi nativního IF1, Origene plasmid (RN207924), USA

Plasmid pro expresi prázdného vektoru, pCMV6-Entry vector, PS100001, Origene, USA

Plasmid pro expresi PercevalHR - 49082, Addgene, USA

4.1.10 Seznam použitých komerčních souprav

Bioluminescence Assay kit - ATP bioluminescence assay kit CLS II, 11699695001, Merck, Sigma-Aldrich, USA

QIAGEN® Plasmid Midi Kit, 12143, Qiagen, Německo

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace INS-1E

Tkáňová kultura INS-1E byla kultivována v kultivačním médiu (viz kapitola 4.1.7). Buněčné linie byly kultivovány v inkubátoru při 37°C a 5% CO₂.

4.2.2 Transfekce buněk INS-1E

Buňky tkáňové kultury INS-1E byly transfekovány plasmidem pomocí Lipofectaminu 2000. V prvním kroku transfekce bylo potřeba smíchat Lipofectamin 2000 s médiem Opti-MEM a ponechat minimálně *5 minut*, aby se utvořily liposomy, které jsou dále schopné proniknout skrze buněčnou membránu. K liposomům byl poté přidán plasmid a směs byla inkubována *20 minut* při pokojové teplotě. Po *20 minutách* byly liposomy obsahující plazmid přidány ke tkáňové kultuře s médiem Opti-MEM a ponechány *1 hodinu* v inkubátoru při 37°C. Po *1 hodině* bylo buňkám přidáno kultivační médium do následujícího dne. Následující den bylo buňkám vyměněno původní kultivační médium za nové a dva dny po transfekci proběhlo měření.

4.2.3 Trypsinace a počítání buněk

Nejprve bylo tkáňové kultuře INS-1E odsáto kultivační médium. Následně byly buňky opláchnuty fosfátovým puftrem PBS a po jeho odsátí byl na buňky aplikován trypsin. Po uvolnění buněk bylo k trypsinu přidáno stejné množství kultivačního média. Suspenze buněk byla převedena do plastové zkumavky, z které bylo *10 µl* suspenze smícháno v poměru *1:1* s *0,4% (m/V)* trypanovou modří. Po důkladném promíchání bylo *10 µl* nanесeno do počítací komůrky. Počítací komůrka byla vložena do automatické počítáčky buněk invitrogen Countess™. Následně byly buňky spočítány a naředěny na požadovanou koncentraci.

4.2.4 Množení plasmidu metodou heat shock

V prvním kroku bylo smícháno *50 µl* suspenze kompetentních bakterií STBL3 (*Escherichia coli*) s *1 µl* plasmidu. Po jemném promíchání byly buňky s plasmidem inkubovány *20 minut* na ledu. Poté byl proveden tepelný šok, umístěním suspenze na *30 sekund* do 42°C. Po *30 sekundách* byly buňky

ponechány 2 *minuty* na ledu. Poté byly buňky smíchány s 1 *ml* LB média, viz kapitola 4.1.7 a inkubovány 60 *minut* v třepacím inkubátoru při 37°C. Po inkubaci byla suspenze aplikována na kultivační agarózové misky (viz kapitola 4.1.7) s antibiotikem kanamycinem, v koncentraci 50 *mg/ml* a ponechána při 37°C přes noc. Následující den byla rezistentní kolonie naočkována do 200 *ml* LB média a inkubována při 37°C přes noc. Z narostlé bakteriální kultury byl poté izolován plasmid komerční soupravou Qiagen, midi-prep, viz kapitola 4.1.10, dle instrukcí výrobce.

4.2.5 Příprava INS-1E buněčné linie se zvýšenou expresí proteinu IF1

Tkáňová kultura INS-1E byla transfekována plazmidem Atpif1 (Origene RN207924), pomocí Lipofectaminu 2000, jak je popsáno v kapitole 4.2.2. Buňky, které stabilně exprimovaly potkanní protein IF1, byly selektovány geneticinem G418 ve finální koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ v kultivačním médiu. Zároveň s touto linií byla transfekována kontrolní buněčná linie exprimující prázdný pCMV6-Entry vector.

4.2.6 Polylysínace mikroskopických skel

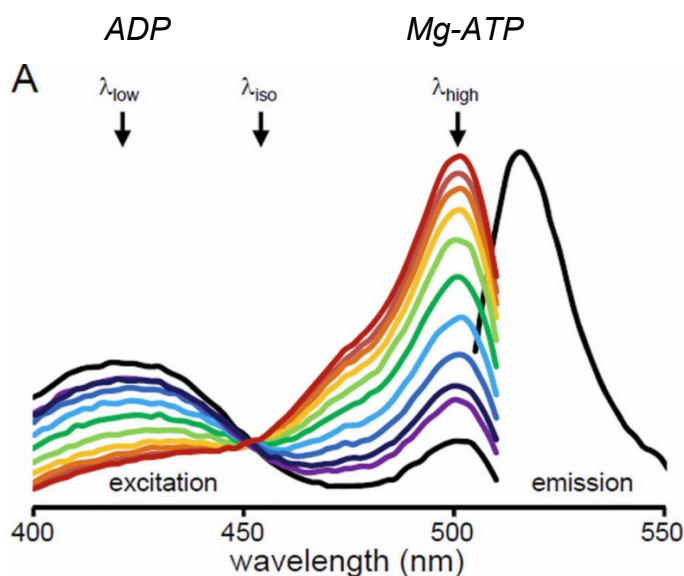
V prvním kroku byla skla očištěna pomocí sonikátoru v 1 *M* roztoku KOH po dobu 1 *hodiny*. Následovaly další dva cykly v sonikátoru po dobu 5 *minut* v destilované vodě. Po oschnutí skel byla skla skladována v methanolu.

Před použitím byla skla krátce sterilizována plamenem, čímž byl odstraněn zbytkový methanol. Po odstranění methanolu byla skla pokryta 200 μl 0,01% (*m/V*) roztoku poly-L-lysinu. Skla se s poly-L-lysinem nechala inkubovat 1 *hodinu* při pokojové teplotě, poté byl poly-L-lysin odstraněn.

4.2.7 Měření poměru buněčného ATP/ADP pomocí fluorescenční sondy PercevalHR

PercevalHR je fluorescenční senzor ATP/ADP, který jsme používali při měření v INS-1E buňkách pomocí fluorescenční, konfokální mikroskopie. ADP se k PercevaluHR váže na stejné vazebné místo, tedy kompetitivně s Mg-ATP, se změnou ~75 *nm* ve vlnové délce excitačního fluorescenčního signálu, tedy 425

nm pro ADP a 500 nm pro Mg-ATP (Tantama et al., 2013). Na grafu fluorescenčního signálu se ukážou jako dva samostatné vrcholy, viz *obrázek 8*.



Obrázek 8 – Fluorescenční excitační a emisní spektra biosenzoru percevalHR. Excitační spektrum od modré k červené zobrazuje narůstající poměr ATP/ADP (Tantama, et al., 2013).

4.2.7.1 Příprava tkáňové kultury

Tkáňová kultura INS-1E se zvýšenou expresí proteinu IF1 nasetá v počtu *120 000 buněk na sklo*, byla pěstována na poly-L-lysinovaných mikroskopických sklech, viz kapitola 4.2.6. Buňky byly transfekovány PercevalHR pomocí Lipofectaminu 2000, jak je popsáno v kapitole 4.2.2.

4.2.7.2 Konfokální fluorescenční mikroskopie

Fluorescence transfekovaných buněk byla snímána na konfokálním fluorescenčním mikroskopu Leica TCS SP8. Buňky byly v prvním kanálu excitovány světlem o vlnové délce 405 nm a emise byla snímána při $520\text{-}550\text{ nm}$. Ve druhém kanálu byly buňky excitovány světlem o vlnové délce 496 nm a emise byla snímána při $520\text{-}550\text{ nm}$. Poměr ATP/ADP, byl analyzován pomocí softwaru Leica LAS AF. Pro ověření funkčnosti experimentu byly buňky před snímáním inkubovány s $5\text{ }\mu\text{M}$ oligomycinem.

4.2.8 Western blot analýza

4.2.8.1 Příprava buněčných lyzátů

Buňky tkáňové kultury INS-1E byly nejprve opláchnuty PBS fosfátovým pufrém, a poté lyzovány lyzačním pufrém. Objem lyzačního roztoku činil $100\ \mu\text{l}$ na jednu jamku šestijamkové kultivační destičky (6WP). Poté byly buněčné lyzáty $10\ \text{minut}$ inkubovány na ledu, a poté stočeny při 4°C a $10\ 000\ g$, po dobu $10\ \text{minut}$, čímž byly odstraněny nežádoucí buněčné kompartmenty. Po centrifugaci byl supernatant převeden do nových plastových $1,5\ \text{ml}$ zkumavek a následně byla stanovena koncentrace proteinu metodou BCA, viz kapitola 4.2.8.2.

4.2.8.2 Stanovení koncentrace proteinu metodou BCA

Pro stanovení koncentrace proteinu metodou BCA bylo potřeba smíchat 5% (V/V) a 10% (V/V) vzorky proteinů s roztokem Bicinchoninové kyseliny a 4% (m/V) roztokem pentahydrátu síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Následně byly vzorky inkubovány $30\ \text{minut}$ při 37°C . Poté byla změřena absorbance na spektrofotometru eppendorf BisPhotometer při $562\ \text{nm}$.

4.2.8.3 Proteinová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecyl-sulfátem sodným

K separaci proteinů byl využíván 15% (m/V) polyakrylamidový gel. Příprava $50\ \text{ml}$ polyakrylamidového gelu proběhla dle následujícího rozpisu:

- H_2O - $4,73\ \text{ml}$
- 30% (m/V) roztok akrylamidu (AA) a bisakrylamidu (BisAA) - $25\ \text{ml}$
- $1\ \text{M Tris-HCl}$ (pH 8,8) - $18,75\ \text{ml}$
- 5% (m/V) dodecyl sulfát sodný (SDS) - $1\ \text{ml}$

Nakonec těsně před aplikací roztoku separačního gelu mezi elektroforetická skla byly přidány dvě „síťovací“ komponenty:

- TEMED - $20\ \mu\text{l}$
- 10% (m/V) APS - $500\ \mu\text{l}$

Namíchaný roztok separačního gelu byl aplikován mezi elektroforetická skla, s mezerou určující tloušťku gelu $1,5\ \text{mm}$, a převrstven vrstvou isopropanolu, který zajistil rovné, hladké zpolymerování hladiny separačního

gelu. Separační gel se nechal na rovném podkladu polymerovat minimálně 20 min.

Po zpolymerování separačního gelu bylo namícháno 16 ml 4% (m/V) zaostřovacího gelu, dle následujícího rozpisu:

- H_2O - 5,4 ml
- 30% (m/V) roztok AA/BisAA - 2 ml
- 0,25 M Tris-HCl (pH 6,8) - 8 ml
- 5% (m/V) dodecyl sulfát sodný (SDS) - 320 μ l

Nakonec těsně před aplikací roztoku zaostřovacího gelu mezi elektroforetická skla byly přidány zmíněné „síťovací“ komponenty:

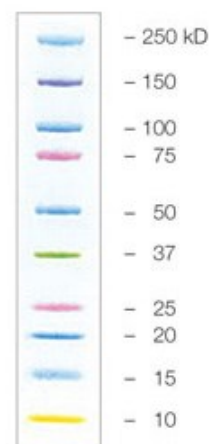
- TEMED - 40 μ l
- 10% (m/V) APS - 240 μ l

Před nanesením zaostřovacího gelu byl nejprve odstraněn isopropanol, a poté byl nanesen zaostřovací gel. Ihned po nanesení mezi skla, byl do gelu umístěn elektroforetický hřebínek, který dále definoval velikost a počet jamek. Zaostřovací gel se opět nechal polymerovat minimálně 20 minut

Celkový obsah proteinů v každém vzorku byl 20 μ g. Ke vzorkům byl přidán pětikrát koncentrovaný vzorkový pufr (5xSB, *sample buffer*), který díky obsahu SDS sjednocuje náboj proteinů, degraduje nekovalentní proteinové vazby, díky glycerolu zabraňuje vztlínání proteinových vzorků, udržuje stabilní pH díky obsahu Tris a vizualizuje vzorky pomocí bromfenolové modři. Ke vzorkům byl dále přidán merkaptoethanol, který rozvolňuje disulfidové můstky v proteinech. Namíchané vzorky se 10 minut inkubovaly při 95°C.

Po 20 minutách polymerace zaostřovacího gelu byly vyjmuty plastové hřebínky a skla s nalitými gely byla umístěna do elektroforetické aparatury BIORAD Mini-Protean 3 Cell. Pro separaci proteinů byl použit elektroodový pufr, viz kapitola 4.1.7 a pro detekci hmotností proteinů byl použit proteinový standard Bio-Rad Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (1610375), viz obrázek 9.

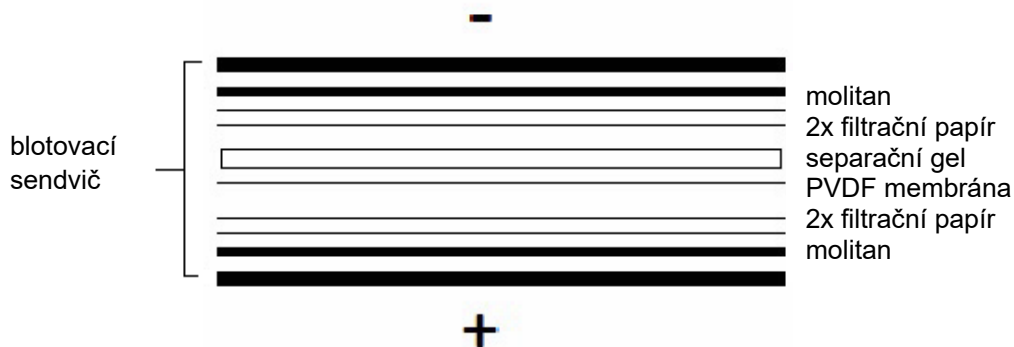
Obrázek 9 – Proteinový standard Bio-Rad Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (www.bio-rad.com)



Po nanesení vzorků byla aparatura připojena ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu s konstantním napětím 75 V. Po zaostření vzorků byla hodnota napětí zvýšena na 150 V. Po dokončení byly separační polyakrylamidové gely použity k dalšímu zpracování metodou Western blot, viz kapitola 4.2.8.4.

4.2.8.4 Přenos separovaných proteinů na membránu: Western blot

Polyakrylamidový gel se separovanými proteiny byl vložen do „blotovacího sendviče“, jehož schéma je znázorněno na obrázku (obrázek 10). Přenos proteinů na PVDF membránu probíhal v aparatuře BIO-RAD Criterion™ Blotter 560BR při 300 mA po dobu 75 minut. Blotovací nádoba byla naplněna transferovým pufrem TBB, viz kapitola 4.1.7 a připojena ke zdroji elektrického napětí (Labnet, ENDURO Power Supplies E0203).



Obrázek 10 – složení „blotovacího sendviče“

Poté byla PVDF membrána s přenesenými proteiny inkubována po dobu 1 hodiny s 5% (m/V) roztokem sušeného mléka v TTBS pufru, viz kapitola 4.1.7.

4.2.8.5 Inkubace v primární a sekundární protilátce

Po 1 hodině inkubace byla PVDF membrána omývána třikrát vždy po 10 minutách pufrům TTBS. Po promytí byla membrána zalita 15 ml primární protilátky proti IF1, nebo proti α -podjednotce ATP syntázy, ředěné 2000x v TTBS pufru, umístěna do 4°C a inkubována do druhého dne.

Následující den byla PVDF membrána omývána třikrát vždy po 10 minutách pufrům TTBS. Po omytí následovala inkubace v sekundární protilátce Goat-Anti-Mouse IgG (A-3562), ředěné 10 000x v TTBS pufru po dobu 1

hodiny. Poté byla opět PVDF membrána omývána třikrát vždy po *10 minutách* pufrům TTBS. Poté byla membrána analyzována na detekčním přístroji LAS-1000.

4.2.8.6 ECL detekce a analýza fotografií

Před snímáním byla membrána inkubována *1 minutu* v roztoku Luminata Forte, viz kapitola 4.1.3. Po inkubaci byla membrána vyfocena za použití přístroje LAS-1000 za přítomnosti světla, tak aby byl čitelný proteinový marker. Poté byla komora uzavřena a další snímání probíhalo ECL (*enhanced chemiluminescence*) světelnou detekcí. ECL světelná intenzita fotografií byla dále kvantifikována v softwaru ImageJ (Wayne Rasband).

4.2.9 2D elektroforéza

4.2.9.1 Příprava vzorků

Proteinové vzorky tkáňové kultury INS-1E byly získány pomocí lyzačního pufru viz kapitola 4.2.8.1 a smíchány s rehydratačním roztokem DeStreak GE Healthcare, s přídavkem *0,5% (V/V)* IPG pufru. Koncentrace izolovaných proteinů byla předem stanovena metodou BCA, viz kapitola 4.2.8.2. Připravené proteinové vzorky na 2D-elektroforézu o koncentraci *350 µg/ml* ve *340 µl* rehydratačního roztoku byly použity pro aktivní rehydrataci stripů s rozmezím *pH 6-11* o délce *7 cm* (*Immobiline DryStrip 7 cm, GE Healthcare*). Aktivní rehydratace stripu probíhala v zařízení Ettan IPGphor II, při *20°C*, přes noc, při stálém napětí *50 V* a proudu *50 µA*.

4.2.9.2 Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace probíhala dle doporučení výrobce za postupného zvyšování napětí do hodnoty *5 kVh* a maximální proud na jeden strip byl *50 µA*. Celkově bylo při IEF nasbíráno *6500 Vhr*.

4.2.9.3 Ekvilibrační rehydratace stripů

Před vlastní elektroforézou byl strip inkubován *15 minut* v ekvilibračním pufru viz kapitola 4.1.7., s přídavkem *1% (m/V)* DTT na horizontální třepačce při pokojové teplotě. Následně byl inkubován dalších *15 minut* v ekvilibračním

pufry s přidavkem 2% (m/V) iodoacetamidu. Před nanesením na gel byl strip krátce omyt destilovanou vodou.

4.2.9.4 SDS-PAGE

Druhým rozměrem 2D-elektroforézy byla elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného viz kapitola 4.2.8.3. Pro druhý rozměr 2D-elektroforézy byl použit 15% (V/V) separační gel. Do zaostřovacího gelu byl vložen speciální hřebínek pro tvorbu jamky na strip. Strip byl po vložení do jamky převrstven 1% (m/V) agarózou. Dále probíhala separace proteinů obdobně, jako v kapitole 4.2.8.3.

4.2.9.5 Přenos separovaných proteinů na membránu: Western blot

Přenos separovaných proteinů na membránu probíhal stejně jako v kapitole 4.2.8.4.

4.2.9.6 Inkubace v primární a sekundární protilátce

Inkubace v primární a sekundární protilátce probíhala stejně jako v kapitole 4.2.8.5.

4.2.9.7 ECL detekce a analýza fotografií

ECL detekce a analýza fotografií probíhala stejně jako v kapitole 4.2.8.6.

4.2.10 Měření koncentrace buněčného ATP

Buňky INS-1E byly nasety v počtu 600 000 buněk na jamku v šestijamkové destičce (6WP). Druhý den po nasetí buněk proběhla výměna kultivačního média za měřicí médium, viz kapitola 4.1.7., s přidavkem glukózy na koncentraci 11 mM. Do jednotlivých jamek byl k buňkám přidán GLP-1R agonista (G8048, Sigma), ve finálních koncentracích: 1 nM, 100 nM a vždy alespoň jedna jamka kontrolní, do které GLP-1R agonista přidán nebyl. Kultivace v modifikovaném RPMI médiu probíhala celkem 16 hodin. Poté byly buňky spočítány, viz kapitola 4.2.3 a fosfátovým pufrem PBS naředěny na jednotnou koncentraci 1 milion buněk/ml. Poté byly desetkrát zředěny ATP pufrem, viz kapitola 4.1.7 a inkubovány při 100°C po dobu 5 minut a následnou centrifugací při 4°C, 1000 g po dobu 1 minuty došlo k usednutí buněčného

debris. Nakonec byly vzorky nanесeny na devadesátišestijamkovou bílou destičku a smíchány v poměru 1:1 s roztokem luciferázy a luciferinu. Bezprostředně po smíchání s luciferázou byla na destičkovém spektrofotometru Synergy HT změřena hodnota luminescence.

4.2.11 Izolace jaterních mitochondrií

Pro účely experimentu byly používáni myši samci ze skupiny KO (*knockout* pro IF1, viz kapitola 4.1.2) a WT (kontrolní skupina, viz kapitola 4.1.2). Po usmrcení myši byla vyjmuta játra a tkáň byla zhomogenizována Potter-elvehjemovým homogenizátorem v sacharózovém médiu (viz kapitola 4.1.7). Homogenizát byl nejprve naředěn v sacharózovém médiu a stočen při 4°C a 1000 g. Supernatant byl přelit do nových zkumavek a stočen při 4°C a 8000 g. Poté byl pelet resuspendován v sacharózovém médiu s BSA bez mastných kyselin (5 mg/ml) a znovu stočen při 4°C a 8000 g. Následně byl pelet resuspendován v sacharózovém médiu bez BSA a stočen při 4°C a 8000 g. Nakonec byl pelet resuspendován ve 200 µl sacharózového média a změřena koncentrace proteinu metodou BCA, viz kapitola 4.2.8.2.

4.2.12 Měření respirace izolovaných jaterních mitochondrií pomocí oxygrafu-2k

V první řadě bylo nutné oxygraf kalibrovat na podmínky měření experimentu. Kalibrace probíhala s respiračním médiem (viz kapitola 4.1.7) pro izolované mitochondrie za přístupu vzduchu a při teplotě 30°C. Při maximální saturaci média kyslíkem měřené Clarkovou elektrodou byl přístroj zkalibrován.

Izolované mitochondrie byly do uzavřené komůrky oxygrafu přidány v koncentraci 0,1 mg/ml. Bezprostředně poté byl do komůrky přidán substrát.

V prvním protokolu bylo do jamky aplikováno 20 µl 0,5 M sukcinátu, 10 µl 1 M glutamátu a 2 µl 1 M malátu. Po ustálení signálu spotřeby kyslíku byly do komůrky přidány 4 µl 500 mM ADP. Po ustálení hladiny dýchání byla mitochondriální ATP syntáza inhibována 1 µl 1 mM oligomycinu A. Následovalo postupné přidávání po 2 µl 250 mM odpřahovacího ionoforu carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) až do dosažení maximální kapacity dýchacího řetězce. Ve druhém protokolu byly do jamky přidány 10 µl 1

M glutamátu a $2\ \mu\text{l}$ $1\ \text{M}$ malátu. Po ustálení signálu spotřeby kyslíku následoval stejný postup jako v prvním protokolu. Ve třetím protokolu bylo do jamky aplikováno $20\ \mu\text{l}$ $0,5\ \text{M}$ sukcinátu a $2\ \mu\text{l}$ $10\ \text{mM}$ rotenonu. Po ustálení signálu spotřeby kyslíku následoval stejný postup jako v prvním protokolu. Ve čtvrtém protokolu byly do jamky přidány $2\ \mu\text{l}$ $250\ \text{mM}$ TMPD s $2\ \mu\text{l}$ $1\ \text{M}$ askorbátu. Po ustálení signálu spotřeby kyslíku následoval stejný postup jako v prvním protokolu.

4.2.13 Statistická analýza

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SD (standardní odchylka). K porovnání sledovaného parametru u dvou skupin dat byl použit studentův t-test. K porovnání více skupin byla použita analýza variance (ANOVA) s Tukeyho post hoc analýzou. V případě nesplnění podmínek normality dat byl použit Kruskal-Wallisův test následovaný posthoc Dunnett's multiple porovnáním vzhledem ke kontrolnímu vzorku. Rozdíly byly považovány za staticky významné při p -hodnotě menší než 0,05 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

5 VÝSLEDKY

Cílem práce bylo získat nové poznatky o mechanismu regulace ATP syntázy proteinem IF1, v pankreatických β -buňkách, a dále prozkoumat respiraci v mitochondriích izolovaných z jater IF1-KO (*IF1 knockout*) myší. Konkrétně byl analyzován poměr množství proteinu IF1 vůči ATP syntáze v pankreatických β -buňkách v závislosti na dostupnosti glukózy. Dále byla metodou 2D separační elektroforézy zjišťována přítomnost post-translačních modifikací proteinu IF1, v pankreatických β -buňkách. V kontrolních INS-1E buňkách a buňkách s nadměrně exprimovaným genem pro IF1 (IF1-OE), byly testovány fyziologické rozdíly v množství buněčného ATP, měřeny rozdíly v aktivitě dýchacího řetězce a byl měřen poměr buněčného ATP/ADP pomocí fluorescenční sondy PercevalHR. Respirace jaterních mitochondrií izolovaných z IF1-KO myší a WT (*wild type*) myší byla porovnána superrezoluční respirometrií, pomocí přístroje oxygraf-2k.

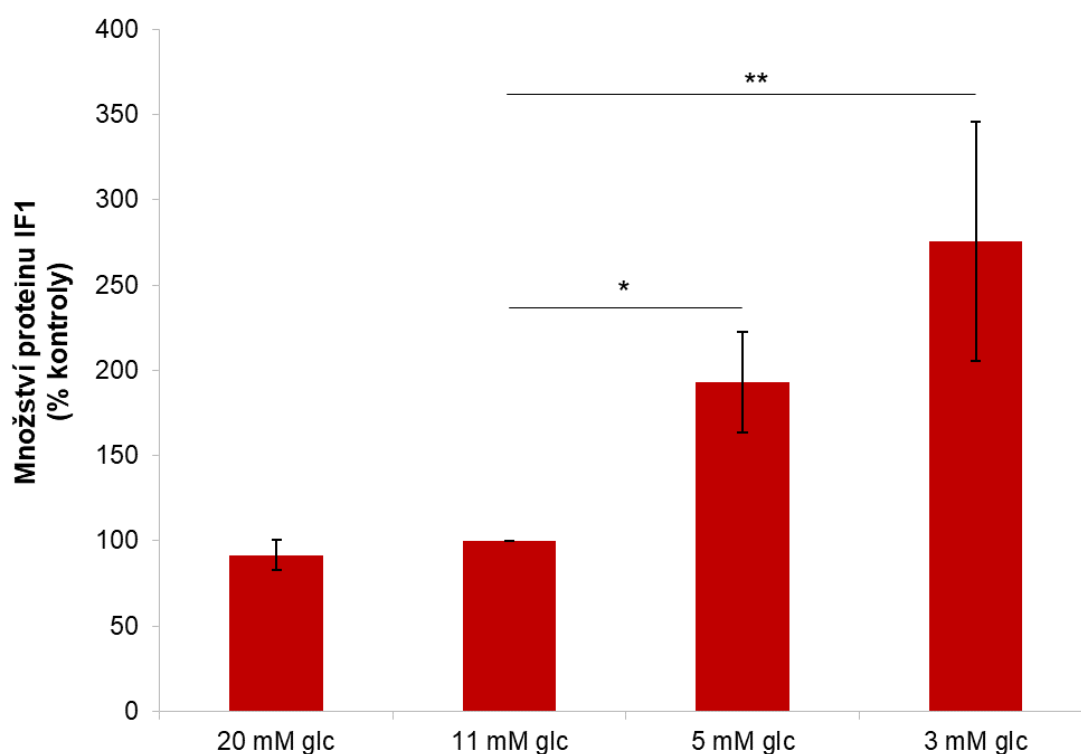
5.1 STECHIOMETRIE IF1 S ATP SYNTÁZOU V PANKREATICKÝCH INS-1E BUŇKÁCH V ZÁVISLOSTI NA OBSAHU GLUKÓZY V MODIFIKOVANÉM RPMI MÉDIU

Dle předchozích publikovaných výsledků (Kahancová et al., 2018) se protein IF1 podílí na regulaci množství sekretovaného inzulínu pankreatickými β -buňkami, tím že reguluje množství buněčného ATP. Zajímalo nás tedy, zda se množství IF1 proteinu v poměru k α podjednotce ATP syntázy bude lišit v závislosti na dostupnosti glukózy.

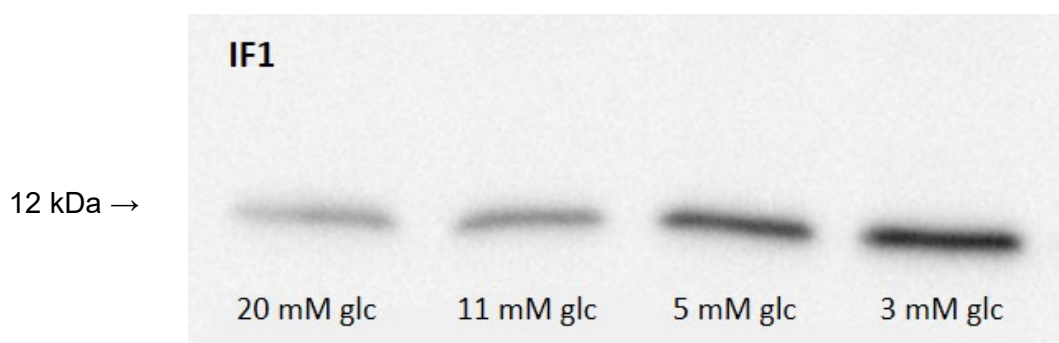
K tomuto experimentu jsme využili klonální modelové pankreatické β -buňky INS-1E (Merglen et al., 2004), které byly inkubovány po dobu 8 hodin ve čtyřech různých koncentracích glukózy (20 mM, 11 mM, 5 mM, 3 mM). Pomocí Western blot analýzy byly kvantifikovány rozdíly v poměru množství proteinu IF1 v tkáňové kultuře INS-1E, vůči podjednotce α mitochondriální ATP syntázy.

Naměřené množství proteinu IF1 bylo nejvyšší ve vzorcích z buněk kultivovaných v 3 mM glukóze, přičemž se stoupající koncentrací glukózy koncentrace proteinu IF1 klesala. Platí tedy v tomto případě nepřímá úměra.

Rozdíl v koncentraci proteinu IF1 mezi vzorky 11 mM glc a 3 mM glc byl velice významný a činil 176%. Lze tedy předpokládat, že takto významný rozdíl bude hrát roli v řízení energetického metabolismu. Průměrné hodnoty jsou zobrazeny níže v *grafu 1*. Na *obrázku 11* lze vidět reprezentativní western blot detekovaného proteinu IF1.

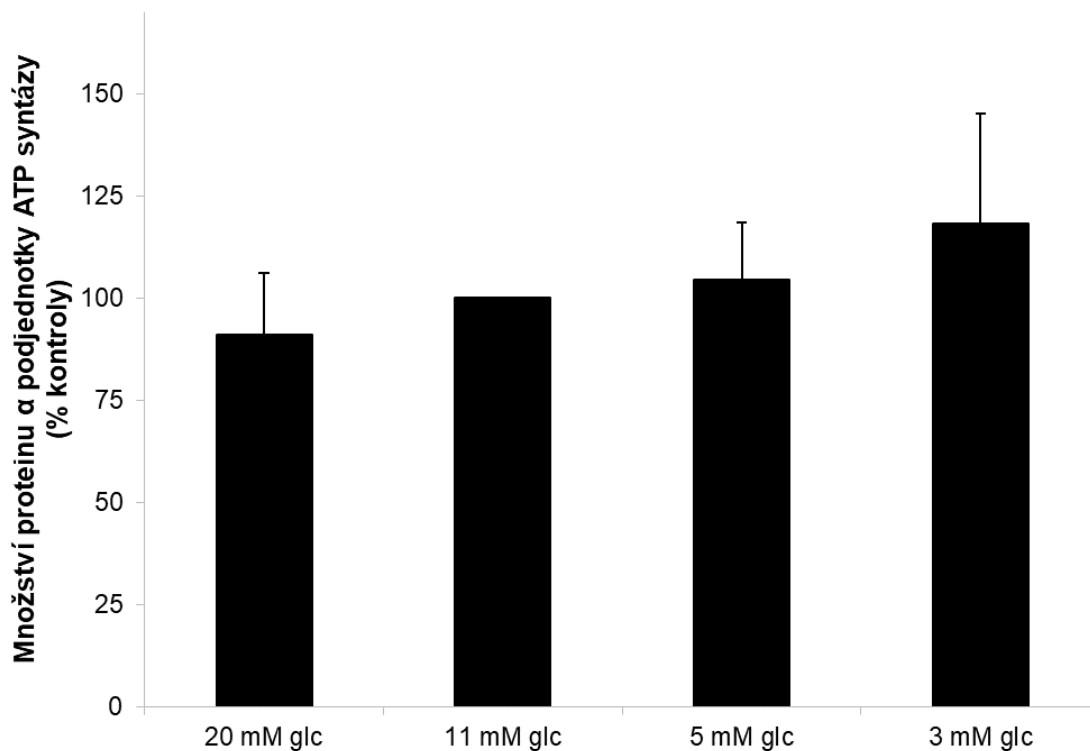


Graf 1 – Koncentrace proteinu IF1 v závislosti na koncentraci glukózy (glc) v kultivačním médiu, vztaženo ke kontrole (11mM glc). Buňky INS-1E byly kultivovány 8 hodin v modifikovaném RPMI médiu s přidanou glukózou. Koncentrace glukózy byly 3 mM, 5 mM, 11 mM (sloužící jako kontrolní) a 20 mM. Pro statistickou analýzu dat byl použit Kruskal-Wallisův test následovaný posthoc Dunnett's multiple porovnáním vzhledem ke kontrole (11 mM glc). Výsledné *p*-hodnoty jsou označeny následovně: (**p*<0,05; ***p*<0,005; ****p*<0,0005).

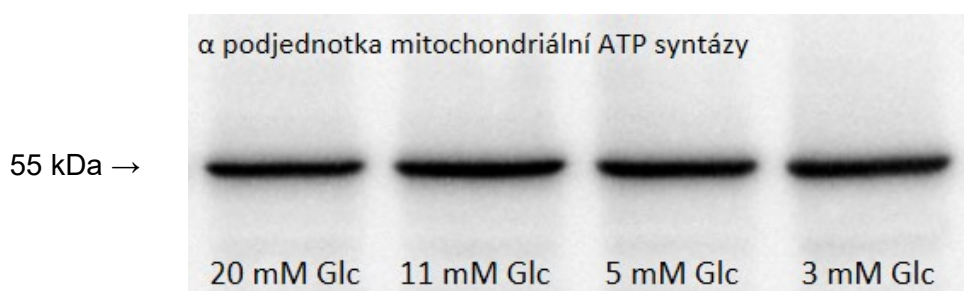


Obrázek 11 – Reprezentativní Western blot s vizualizovaným IF1. Buňky INS-1E byly kultivovány 8 hodin v modifikovaném RPMI médiu s přidanou glukózou. Koncentrace glukózy byly 3 mM, 5 mM, 11 mM (sloužící jako kontrolní) a 20 mM.

Hodnoty koncentrace ATP syntázové podjednotky α nebyly v případě rozdílných koncentrací glukózy v modifikovaném RPMI médiu nijak výrazně odlišné. Zaznamenaný rozdíl v koncentraci ATP syntázové podjednotky α , mezi vzorky 11 mM glc a 3 mM glc nebyl statisticky signifikantní, a činil pouze 18%. Průměrné hodnoty jsou zobrazeny níže v grafu 2. Na obrázku 12 lze vidět reprezentativní Western blot detekované α podjednotky mitochondriální ATP syntázy.

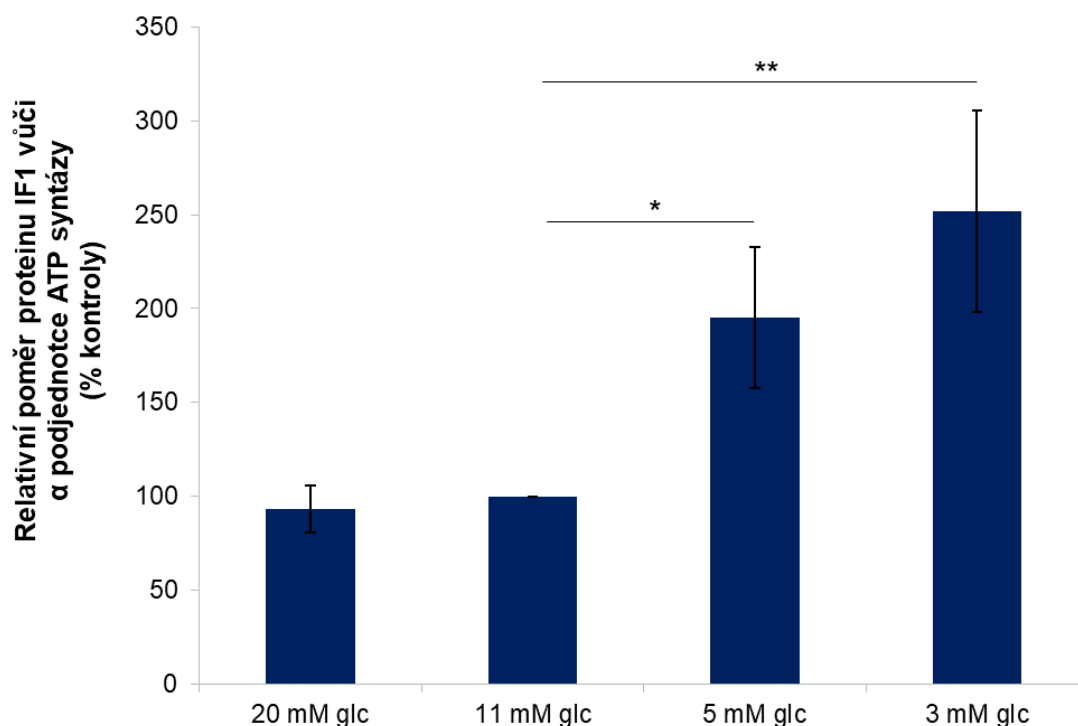


Graf 2 – Koncentrace ATP syntázové podjednotky α , v závislosti na koncentraci glukózy (glc) v kultivačním médiu, vztaženo ke kontrole (11mM glc). Pro statistickou analýzu dat byl použit Kruskal-Walissův test následovaný posthoc Dunnett's multiple porovnáním vzhledem ke kontrole (11 mM glc). Výsledné p-hodnoty jsou označeny následovně: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).



Obrázek 12 – Reprezentativní Western blot s vizualizovanou podjednotkou α ATP syntázy. Buňky INS-1E byly kultivovány 8 hodin v modifikovaném RPMI médiu s přidanou glukózou. Koncentrace glukózy byly 3 mM, 5 mM, 11 mM (sloužící jako kontrolní) a 20 mM.

Výsledný rozdíl v koncentraci proteinu IF1 vůči α podjednotce ATP syntázy, mezi vzorky 11 mM glc a 3 mM glc činil 152% a je zobrazen v *grafu 3*. Nejvyšší poměr byl detekován při inkubaci v 3 mM glukóze. Jedná se tedy o velice významný rozdíl, který si zaslouží další pozornost.



Graf 3 – Relativní poměr proteinu IF1 vůči α podjednotce ATP syntázy, v závislosti na koncentraci glukózy (glc) v kultivačním médiu, vztaženo ke kontrole (11 mM glc). Pro statistickou analýzu dat byl použit Kruskal-Wallisův test následovaný posthoc Dunnett's multiple porovnáním vzhledem ke kontrole (11 mM glc). Výsledné p -hodnoty jsou označeny následovně: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

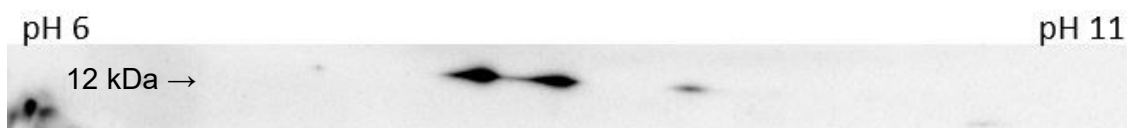
5.2 POST-TRANSLAČNÍ MODIFIKACE IF1 V PANKREATICKÝCH INS-1E BUŇKÁCH

Regulační mechanismy ovlivňující interakce proteinu IF1 s ATP syntázou zahrnují mimo jiné pH regulované změny v náboji histidinů a post-translační modifikace. Konkrétně byla popsána fosforylace IF1 na serinu 39 (S39), pomocí protein kinázy A (PKA), (García-Bermúdez et al., 2015). Fosforylace S39 způsobí inaktivaci IF1, ve smyslu zabránění vazby k ATP syntáze a inhibici její aktivity. V této publikaci bylo také zjištěno, že fosforylace S39 je tkáňově specifická, a proto nás zajímalo, zda je IF1 fosforylován i v pankreatických β -buňkách.

Pomocí metody separační proteinové 2D elektroforézy, byla zkoumána přítomnost post-translačních modifikací proteinu IF1, které se vzájemně liší rozdílným izoelektrickým bodem (pI). Pro účely experimentu byl použit lyzát tkáňové kultury INS-1E, který byl nejprve izoelektricky fokusován na lineárním 7 cm dlouhém Immobiline DryStrip s rozmezím pH 6-11 a ve druhém kroku separován pomocí metody SDS-PAGE. Protože je IF1 relativně malý protein, o velikosti 12 kDa, probíhal druhý rozměr separační proteinové elektroforézy v 15% (m/V) polyakrylamidovém gelu. Pomocí metody Western blot a následnou imunodetekcí IF1 protilátkou byly detekovány jednotlivé izoformy IF1, viz *obrázek 13*. Defosforylovaná aktivní izoforma má izoelektrický bod přibližně na hodnotách pH 9,0 a fosforylovaná neaktivní v rozmezí pH 7,7-8,3, což je v souladu s experimenty, provedenými na jiných typech tkání (García-Bermúdez et al., 2015). Abychom lépe odlišili jednotlivé izoformy, byla izoelektrická fokusace zopakována na lineárním 18 cm dlouhém Immobiline DryStrip s rozmezím pH 6-11, viz *obrázek 14*. Pomocí těchto experimentů jsme tedy zjistili, že IF1 je cílem post-translačních modifikací v pankreatických β -buňkách.



Obrázek 13 – *INS-1E* lyzát byl izoelektricky separován na lineárním 7 cm stripu. Následně byl rozdělen metodou SDS-PAGE a přenesen na PVDF membránu metodou Western blot. Na obrázku lze vidět 3 izoformy IF1, o molekulové hmotnosti 12 kDa. Fosforylovaný protein IF1 se nachází zhruba v rozmezí hodnot pH 7,7 až 8,3. Defosforylovaný protein IF1 se nachází zhruba na hodnotě pH 9.

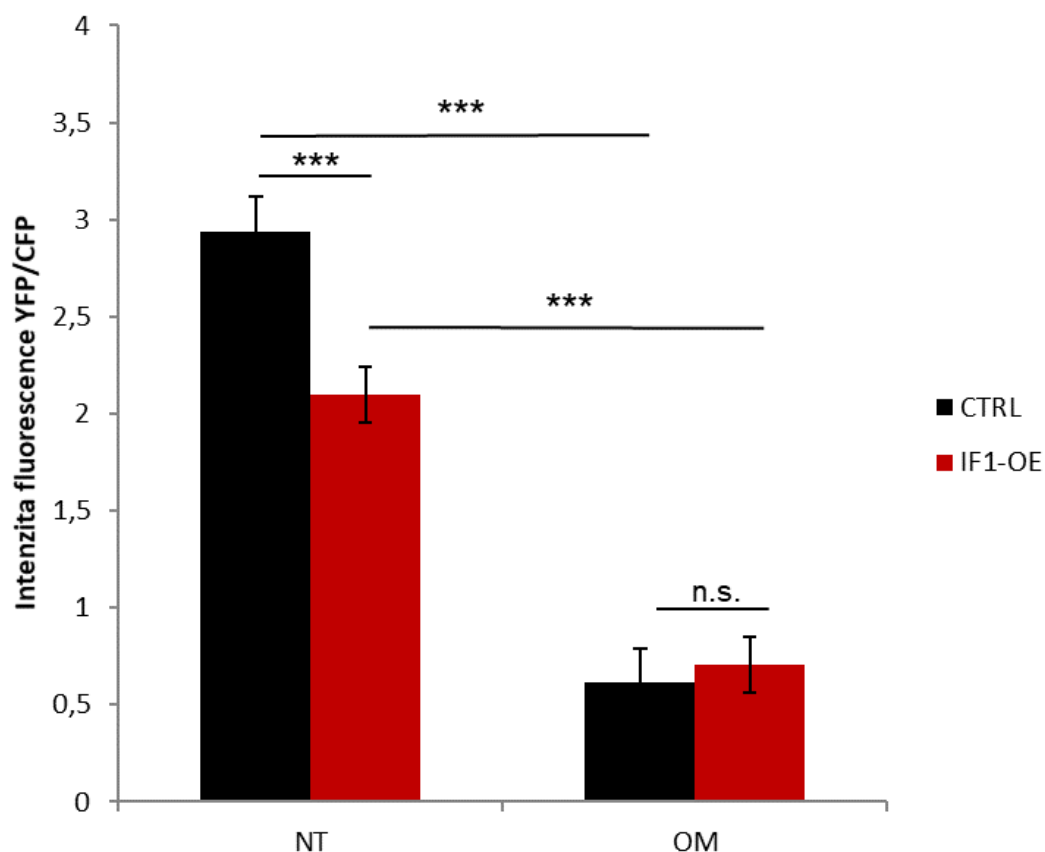


Obrázek 14 – separovaný protein IF1 na 18 cm stripu. Na obrázku lze vidět 3 izoformy IF1, o molekulové hmotnosti 12 kDa. Fosforylovaný protein IF1 se nachází zhruba v rozmezí hodnot pH 7,7 až 8,3. Defosforylovaný protein IF1 se nachází zhruba na hodnotě pH 9.

5.3 ZVÝŠENÁ EXPRESE PROTEINU IF1 SNIŽUJE POMĚR CYTOSOLICKÉHO ATP/ADP

Na základě předchozích výsledků naší laboratoře, které ukázaly, že zvýšená exprese IF1 proteinu snižuje v pankreatických β -buňkách koncentraci buněčného ATP (Kahancová et al., 2020), nás zajímal celkový poměr cytosolického ATP/ADP. Je známo, že určitá frakce buněčného ATP je v pankreatických β -buňkách vázána v inzulinových granulích a je metabolicky neaktivní (Leitner et al., 1975). Výhodou biosenzoru percevalHR, který byl v této práci použit, je mimo jiné to, že monitoruje pouze metabolicky aktivní ATP/ADP, které je podle některých studií klíčové pro uzavírání K_{ATP} kanálu (Martin et al., 2014).

K ověření rozdílů v poměru koncentrací ATP/ADP, v buňkách se zvýšenou expresí IF1 (IF1-OE), byl použit biosenzor PercevalHR na bázi FRET. Buňky se zvýšenou expresí IF1 a odpovídající kontrolní buňky, byly transfekovány plazmidem PercevalHR, jak je popsáno v kapitole 4.2.2. Poměr fluorescencí CFP a YFP poskytl odhad hladin cytosolického ATP a ADP. Poměr ATP/ADP byl snížen u buněk se zvýšenou expresí IF1, jak je vidět v grafu 4, poklesem intenzity fluorescence YFP/CFP u IF1-OE o 28%. Pro ověření funkčnosti sondy monitorovat koncentrace ATP a ADP byly buňky INS-1E inkubovány inhibitorem ATP syntázy, 1 μ M oligomycinem-A, po dobu 1 hodiny. Inhibice vedla k poklesu pozorovaných hladin volného ATP dle očekávání. Hladiny ATP/ADP byly po inhibici oligomycinem-A podobné jak u kontrolních buněk, tak i IF1-OE buněk, viz graf 4.

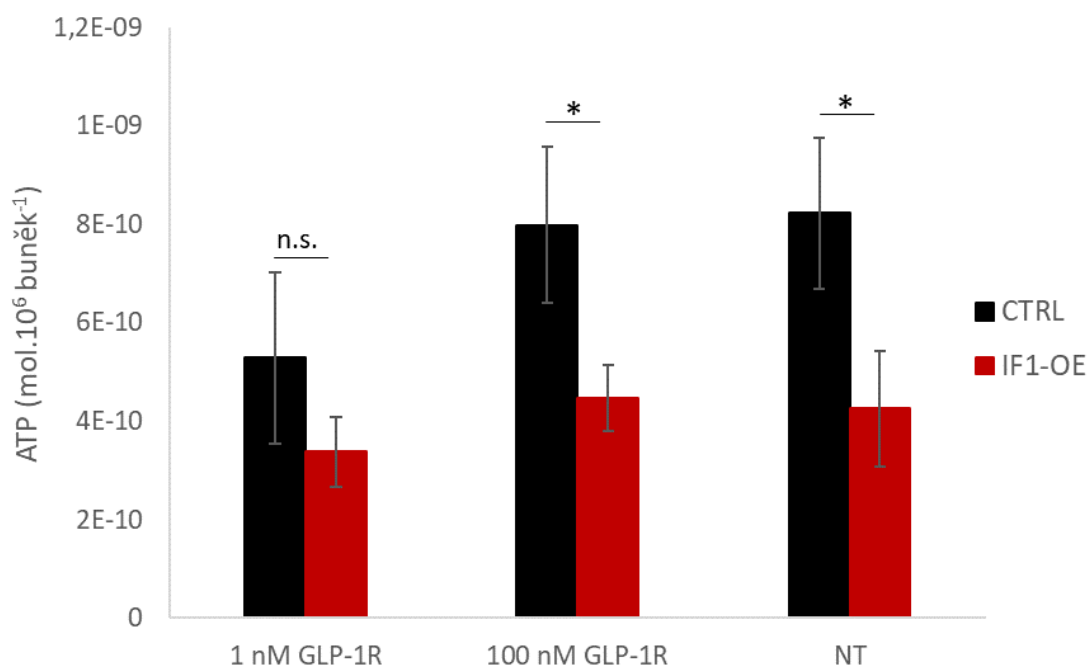


Graf 4 – Poměr cytosolického ATP/ADP stanoveného biosenzorem percevalHR. Poměr fluorescenční intenzity YFP/CFP byl měřen v kontrolní INS-1E linii (CTRL, non treated - NT) a stabilní linii INS-1E se zvýšenou expresí nativního IF1 proteinu (IF1-OE, NT). Dále byl měřen poměr YFP/CFP u těchto linií po inkubaci 1 h s 5 μ M oligomycinem-A (OM). K porovnání více skupin byla použita analýza variance (ANOVA) s Tukeyho post hoc analýzou, p-hodnoty jsou označeny následovně: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

5.4 ÚČINEK GLP-1R AGONISTY NA KONCENTRACI BUNĚČNÉHO ATP V INS-1E BUŇKÁCH SE ZVÝŠENOU EXPRESÍ PROTEINU IF1

Z předchozích výsledků naší laboratoře je zřejmé, že dibutyryl-cAMP (db-cAMP) aktivuje PKA a ruší tak efekt zvýšené exprese proteinu IF1, na koncentraci buněčného ATP (Kahancová et al., 2020). Aktivace GLP-1 receptoru by mimo jiné měla vést k aktivaci PKA dráhy. Proto nás zajímalo, zda podobného efektu jako s db-cAMP, lze docílit s použitím GLP-1R agonisty, který podle jiných studií aktivuje mimo jiné PKA (Bao et al., 2015).

Pro odhad celkového buněčného ATP v buněčných lyzátech jsme použili luciferázový test. K experimentu byla použita stabilní linie INS-1E, se zvýšenou expresí nativního proteinu IF1 a kontrolní INS-1E linie. Při inkubaci *8 hodin* v *1 nM* a *100 nM* GLP-1R agonisty, nebyly pozorovány žádné signifikantní účinky. INS-1E buňky se zvýšenou expresí proteinu IF1 (IF1-OE), inkubované v modifikovaném RPMI médiu, s *11 mM* glukózou a *1 nM* GLP-1R agonistou, dosahovaly koncentrací buněčného ATP na *1 milion* buněk, oproti kontrolním buňkám v průměru z *64%*. IF1-OE buňky inkubované se *100 nM* GLP-1R agonistou, dosahovaly oproti kontrolním buňkám v průměru *56%* koncentrace buněčného ATP na *1 milion* buněk. V případě INS-1E buněk neinkubovaných s GLP-1R agonistou, dosahovaly IF1-OE oproti kontrolním buňkám v průměru *52%* na *1 milion* buněk. V této diplomové práci nicméně nebylo pozorováno, že by měl GLP-1R agonista stejné účinky jako db-cAMP. Průměrné hodnoty koncentrace buněčného ATP jsou uvedeny v *grafu 5*.



Graf 5 – *Koncentrace buněčného ATP v přepočtu na 1 milion buněk INS-1E. CTRL značí kontrolní buňky, IF1-OE značí buňky se zvýšenou expresí proteinu IF1. Vlevo jsou buňky inkubované 16 hodin v modifikovaném RPMI médiu s 1 nM GLP-1R agonistou. Uprostřed jsou buňky inkubované 16 hodin v modifikovaném RPMI médiu s 100 nM GLP-1R agonistou. Vpravo jsou buňky inkubované 16 hodin v modifikovaném RPMI médiu bez přídavku GLP-1R agonisty (non treated - NT). Pro porovnání dvou skupin byl použit studentův t-test, p-hodnoty jsou označeny následovně: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).*

5.5 IF1 KNOCKOUT SNIŽUJE RESPIRACI IZOLOVANÝCH JATERNÍCH MITOCHONDRÍÍ

Na celotělových *IF1 knockout* (IF1-KO) myších nebyla respirace izolovaných mitochondrií nikdy studována, přestože tyto experimenty mohou přispět k objasnění funkce daného proteinu v respiračním řetězci.

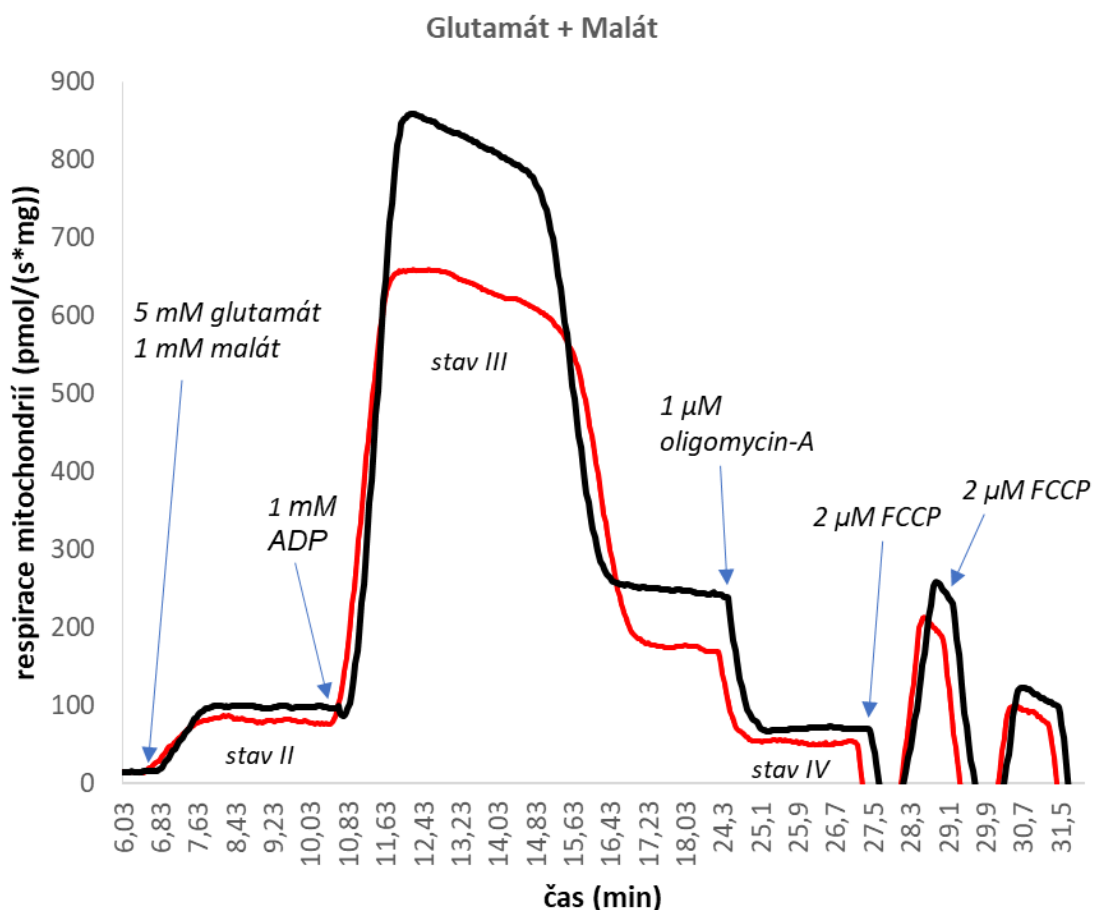
Pro studium mitochondriální respirace byl použit vysokorezoluční respirometr oxygraf-2k. Mitochondrie byly aplikovány do vzduchotěsné měřicí komůrky ve 2 ml respiračního média a s přidáváním různých energetických substrátů byla měřena spotřeba kyslíku. Konkrétně byly použity tyto substráty: 1) glutamát a malát, což jsou substráty komplexu I; 2) sukcinát, substrát komplexu II (při současné inhibici komplexu I rotenonem); 3) glutamát, malát a sukcinát, substráty komplexu I a II; 4) TMPD (redukováný askorbátem), redukuje cytochrom c, tedy substrát komplexu IV. Hodnota respiračního stavu II byla odečtena po ustálení spotřeby kyslíku v přítomnosti daného substrátu, izolovanými mitochondriemi. Respirační stav III byl zkoumán po přidání ADP, čímž se plně aktivovala ATP syntáza. Křivka měla po přidání ADP různý charakter, lišící se podle typu předchozích substrátů a podle typu tkáně. Respirační stav IV byl zkoumán přidáním oligomycinu-A, který inhiboval aktivitu ATP syntázy. Hodnota stavu IV byla odečtena po ustálení spotřeby kyslíku izolovanými mitochondriemi. Maximální respirační kapacita byla zkoumána přidáváním umělého odpráhovače elektrochemického gradientu, karbonylkyanidu-p-trifluormethoxyfenylhydrazonu (FCCP).

Mitochondrie jaterní tkáně z celotělového *IF1 knockout* myšího samce vykazovaly nižší spotřebu kyslíku, oproti mitochondriím z *wild type* myšího samce, jak je vidět v *grafu 6, 8 a 10*.

Průběh respirace izolovaných jaterních mitochondrií ($pmol/(s*mg)$), po přidání substrátů pro komplex I, glutamátu a malátu, je zobrazen viz *graf 6*. Do měřicí komůrky oxygrafu o objemu 2 ml, bylo přidáno 0,2 mg jaterních mitochondrií. Průměrné hodnoty jsou zobrazeny v *grafu 7*. Bazální respirace mitochondrií se substrátem (respirační stav II) se ustálila na hodnotě 85,2 $pmol/(s*mg)$ pro kontrolní (wt) a 78,6 $pmol/(s*mg)$ pro IF1-KO mitochondrie. Po přidání substrátu ADP (stav III) průměrné hodnoty stavu III byly 726,5

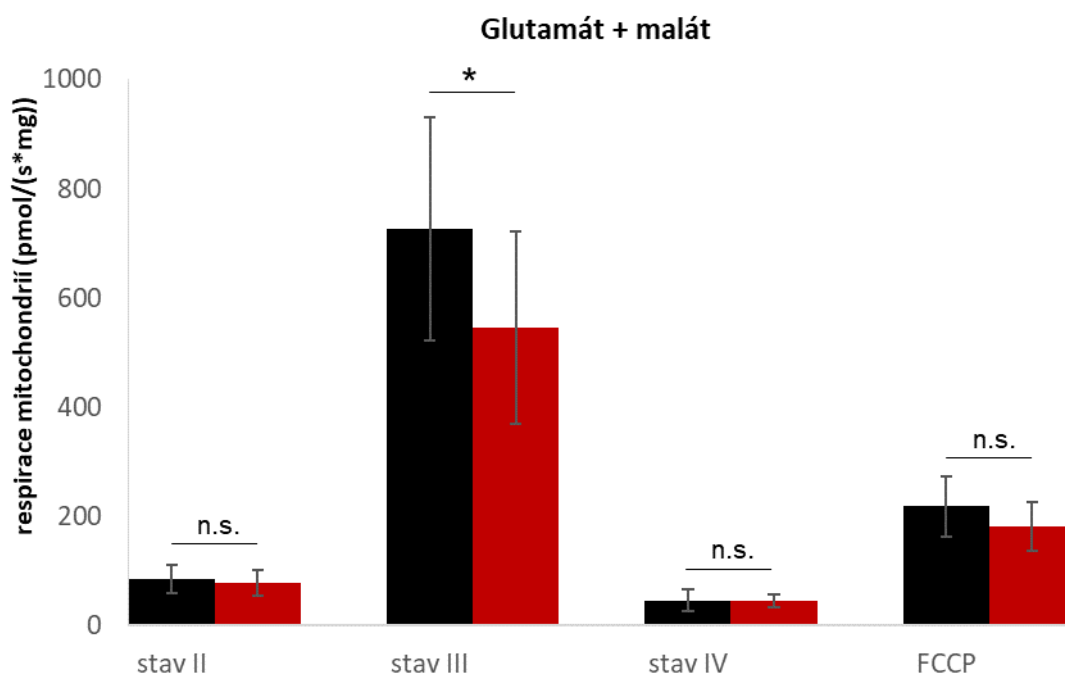
$\text{pmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ pro wt a $546,3 \text{ pmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie. Mitochondrie poté zpracovávaly přidané ADP a hodnota respirace pomalu klesala. Po ustálení hodnoty respirace byl k mitochondriím přidán oligomycin-A, který inhiboval mitochondriální ATP syntázu (stav IV). Průměrné hodnoty stavu IV byly $46,2 \text{ pmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ pro wt a $44,8 \text{ pmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie. Elektrochemický gradient byl poté zredukován přidáváním FCCP, čímž byla měřena maximální kapacita dýchacího řetězce, bez funkce ATP syntázy. Průměrné hodnoty maximální kapacity dýchacího řetězce činily pouze $218,6 \text{ pmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ pro wt a $181,9 \text{ pmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie.

Při použití glutamátu a malátu, jakožto substrátů komplexu I, byly pozorovány signifikantní rozdíly mezi IF1-KO a WT izolovanými mitochondriemi ve stavu III, viz graf 7.



Graf 6 – Reprezentativní graf zobrazující průběh respirace izolovaných jaterních mitochondrií ($\text{pmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$), po přidání substrátů: glutamátu a malátu. Dále byly přidávány látky v pořadí a koncentracích, jak je uvedeno v grafu.

Význam jednotlivých respiračních stavů je vysvětlen v textu. Černá křivka zobrazuje respiraci WT mitochondrií, zatímco červená křivka zobrazuje respiraci IF1-KO mitochondrií.

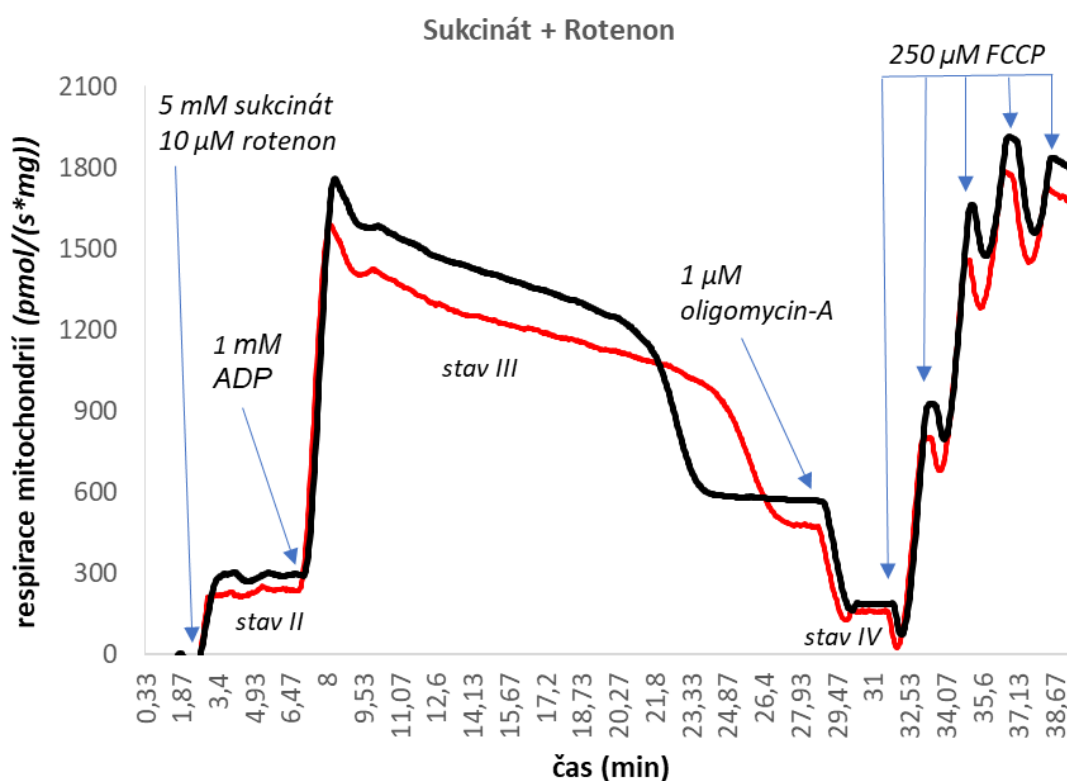


Graf 7 – Průměrná respirace mitochondrií ($\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$), za použití substrátu glutamátu a malátu. Černé sloupce zobrazují respiraci WT mitochondrií, zatímco červené sloupce zobrazují respiraci IF1-KO mitochondrií. Význam jednotlivých respiračních stavů je vysvětlen v textu. Pro porovnání dvou skupin byl použit studentův *t*-test, *p*-hodnoty jsou označeny následovně: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

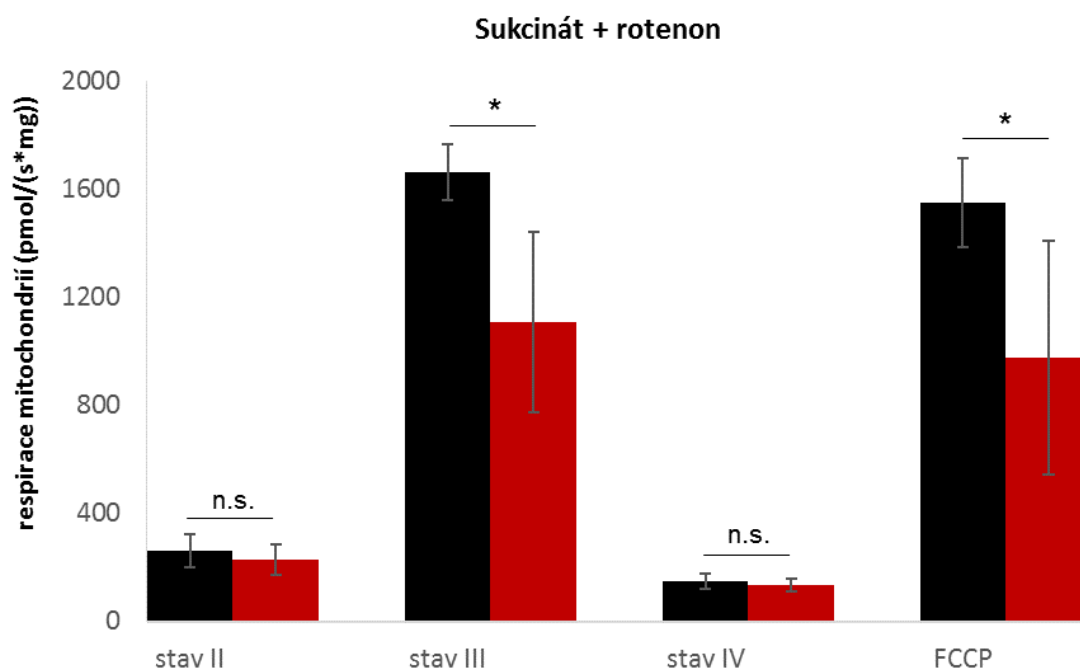
Průběh respirace izolovaných jaterních mitochondrií ($\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$), po přidání substrátu pro komplex II, sukcinátu a inhibitoru komplexu I, rotenonu, je zobrazen viz graf 8. Do měřicí komůrky oxygrafu o objemu 2 ml, bylo přidáno 0,2 mg jaterních mitochondrií. Průměrné hodnoty jsou zobrazeny v grafu 9. Bazální respirace mitochondrií se substrátem (respirační stav II) se ustálila na hodnotě $262,7 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro kontrolní (wt) a $227,9 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie. Po přidání substrátu ADP (stav III) průměrná hodnota respirace vystoupala na $1662,4 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro wt a $1109,4 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie. Mitochondrie poté zpracovávaly přidané ADP a hodnota respirace

pomalu klesala. Po ustálení hodnoty respirace byl k mitochondriím přidán oligomycin-A, který inhiboval mitochondriální ATP syntázu (stav IV). Průměrné hodnoty stavu IV byly $149,3 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro wt a $133,2 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie. Elektrochemický gradient byl poté zredukován přidáváním FCCP, čímž byla měřena maximální kapacita dýchacího řetězce. Průměrné hodnoty maximální kapacity dýchacího řetězce činily $1553 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro wt a $978,8 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie.

Při použití sukcinátu jako substrátu komplexu II a současné inhibici komplexu I rotenonem, byly pozorovány signifikantní rozdíly mezi IF1-KO a WT izolovanými mitochondriemi ve stavu III a v odpřaženém stavu, viz graf 9.



Graf 8 – reprezentativní graf zobrazující průběh respirace izolovaných jaterních mitochondrií ($\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$), po přidání substrátu sukcinátu a inhibitoru komplexu I, rotenonu. Dále byly přidávány látky v pořadí a koncentracích, jak je uvedeno v grafu. Význam jednotlivých respiračních stavů je vysvětlen v textu. Černá křivka zobrazuje respiraci WT mitochondrií, zatímco červená křivka zobrazuje respiraci IF1-KO mitochondrií.

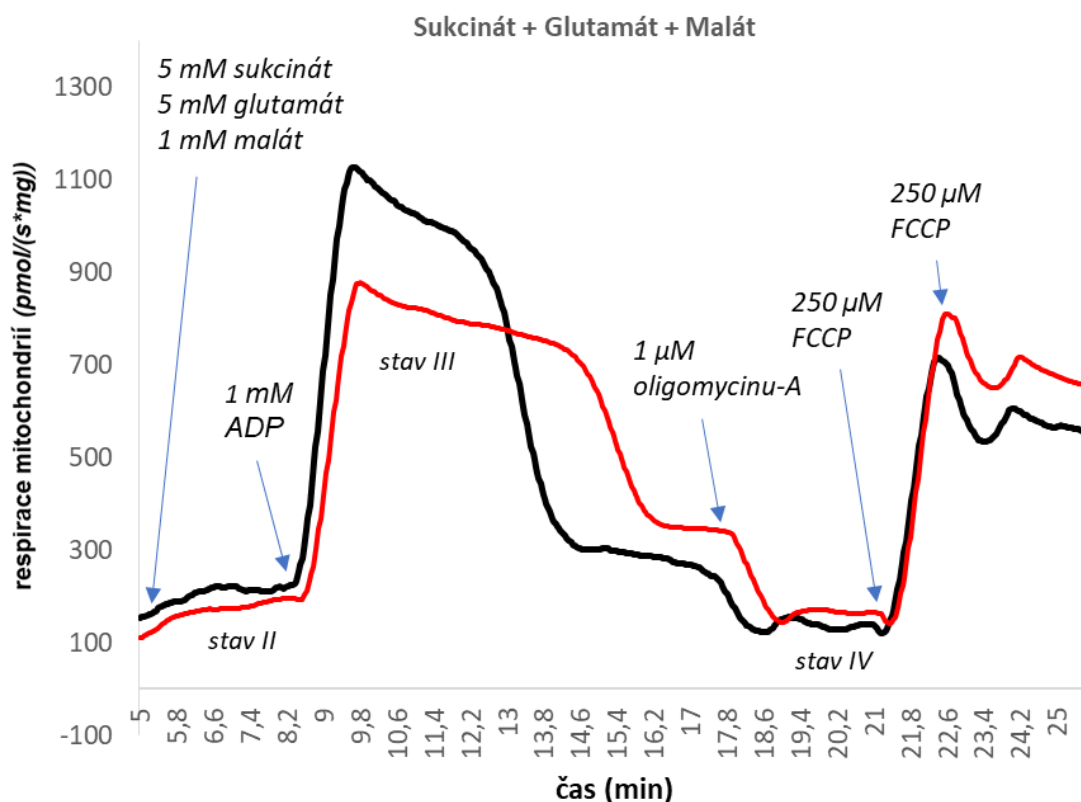


Graf 9 – Průměrná respirace mitochondrií ($\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$), za použití substrátu sukcinátu a inhibitoru komplexu I, rotenonu. Černé sloupce zobrazují respiraci WT mitochondrií, zatímco červené sloupce zobrazují respiraci IF1-KO mitochondrií. Význam jednotlivých respiračních stavů je vysvětlen v textu. Pro porovnání dvou skupin byl použit studentův t-test, p-hodnoty jsou označeny následovně: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

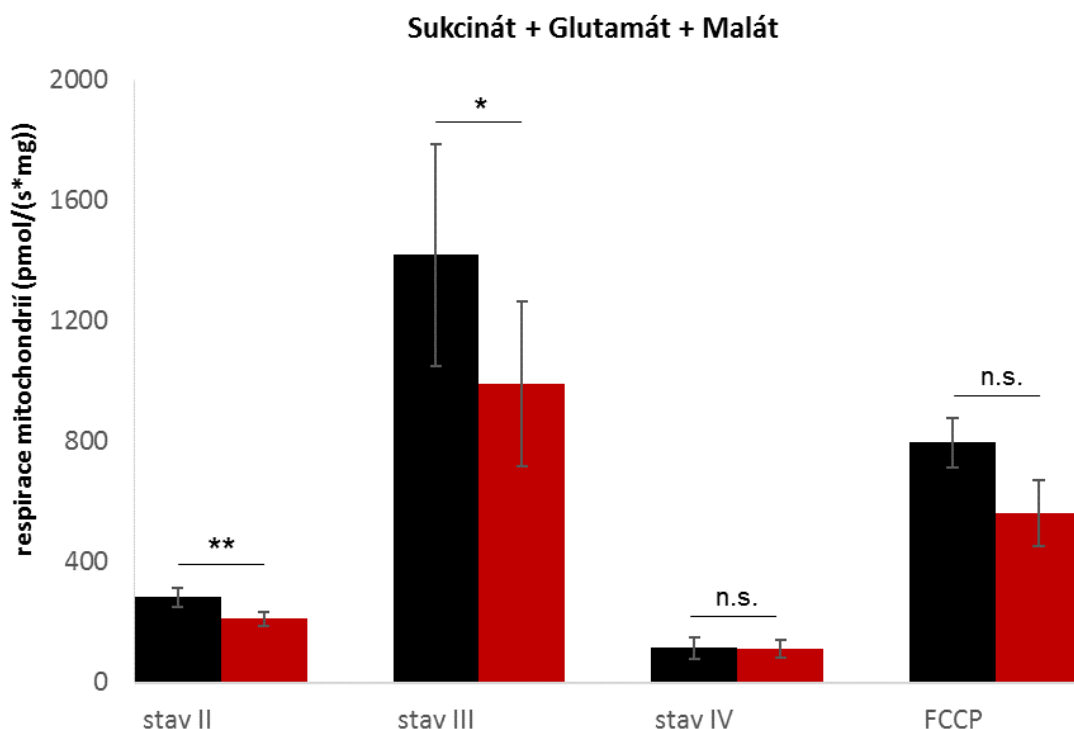
Průběh respirace izolovaných jaterních mitochondrií ($\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$), po přidání substrátu glutamátu, malátu a sukcinátu, substrátů pro komplex I a II, je znázorněna viz graf 10. Do měřicí komůrky oxygrafu o objemu 2 ml, bylo přidáno 0,2 mg jaterních mitochondrií. Průměrné hodnoty jsou zobrazeny v grafu 11. Bazální respirace mitochondrií se substrátem (respirační stav II) byly 282,9 $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro kontrolní (wt) a 211,3 $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro IF1-KO. Po přidání substrátu ADP (stav III) průměrná hodnota respirace vystoupala na 1420,7 $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro wt a 993 $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie. Mitochondrie poté zpracovávaly přidané ADP a hodnota respirace pomalu klesala. Po ustálení hodnoty respirace byl k mitochondriím přidán oligomycin-A, který inhiboval mitochondriální ATP syntázu (stav IV). Průměrné hodnoty stavu IV byly 114,7 $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro wt a 112,6 $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie. Elektrochemický gradient byl poté zredukován přidáváním FCCP, čímž byla

měřena maximální kapacita dýchacího řetězce. Průměrné hodnoty maximální kapacity dýchacího řetězce činily $796,8 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro wt a $562 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie.

Při použití sukcinátu, glutamátu a malátu jakožto substrátů, byly pozorovány signifikantní rozdíly mezi IF1-KO a WT izolovanými mitochondriemi, ve stavech II a III, viz *graf 11*.



Graf 10 – Reprezentativní graf zobrazující průběh respirace izolovaných jaterních mitochondrií ($\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$), po přidání substrátů sukcinátu, glutamátu a malátu. Dále byly přidávány látky v pořadí a koncentracích, jak je uvedeno v grafu. Význam jednotlivých respiračních stavů je vysvětlen v textu. Černá křivka zobrazuje respiraci WT mitochondrií, zatímco červená křivka zobrazuje respiraci IF1-KO mitochondrií.

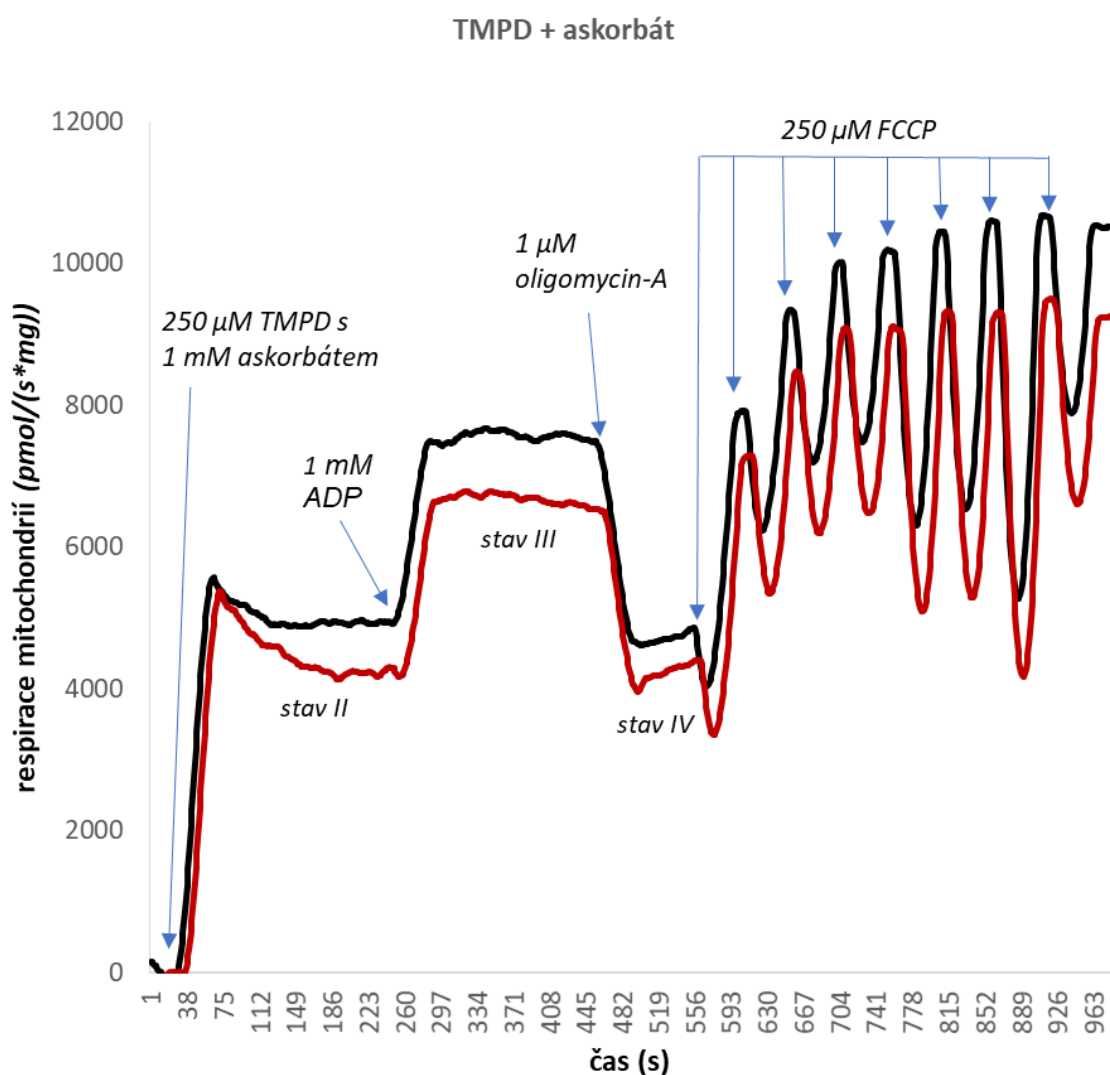


Graf 11 – Průměrná respirace mitochondrií ($\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$), za použití substrátu sukcinátu, glutamátu a malátu. Černé sloupce zobrazují respiraci WT mitochondrií, zatímco červené sloupce zobrazují respiraci IF1-KO mitochondrií. Význam jednotlivých respiračních stavů je vysvětlen v textu. Pro porovnání dvou skupin byl použit studentův t-test, p -hodnoty jsou označeny následovně: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

TMPD je specifický substrát redukující cytochrom c, který snadno oxiduje, a proto je nutné TMPD přidávat zároveň s askorbátem. Redukovaný cytochrom c je poté substrátem pro komplex IV. Průběh respirace izolovaných jaterních mitochondrií ($\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$), po přidání TMPD a askorbátu, zobrazuje *graf 12*. Do měřicí komůrky oxygrafu o objemu 2 ml, bylo přidáno 0,2 mg jaterních mitochondrií. Průměrné hodnoty jsou zobrazeny v *grafu 13*. Bazální respirace mitochondrií se substrátem (respirační stav II) byly 4613,6 $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro kontrolní (wt) a 4277,6 $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie. Po přidání substrátu ADP (stav III) průměrně respirace vystoupala na 6748,6 $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro wt a 5997,6 $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie. Mitochondrie poté zpracovávaly přidané ADP a hodnota respirace pomalu klesala. Po ustálení hodnoty respirace byl k mitochondriím přidán oligomycin-A,

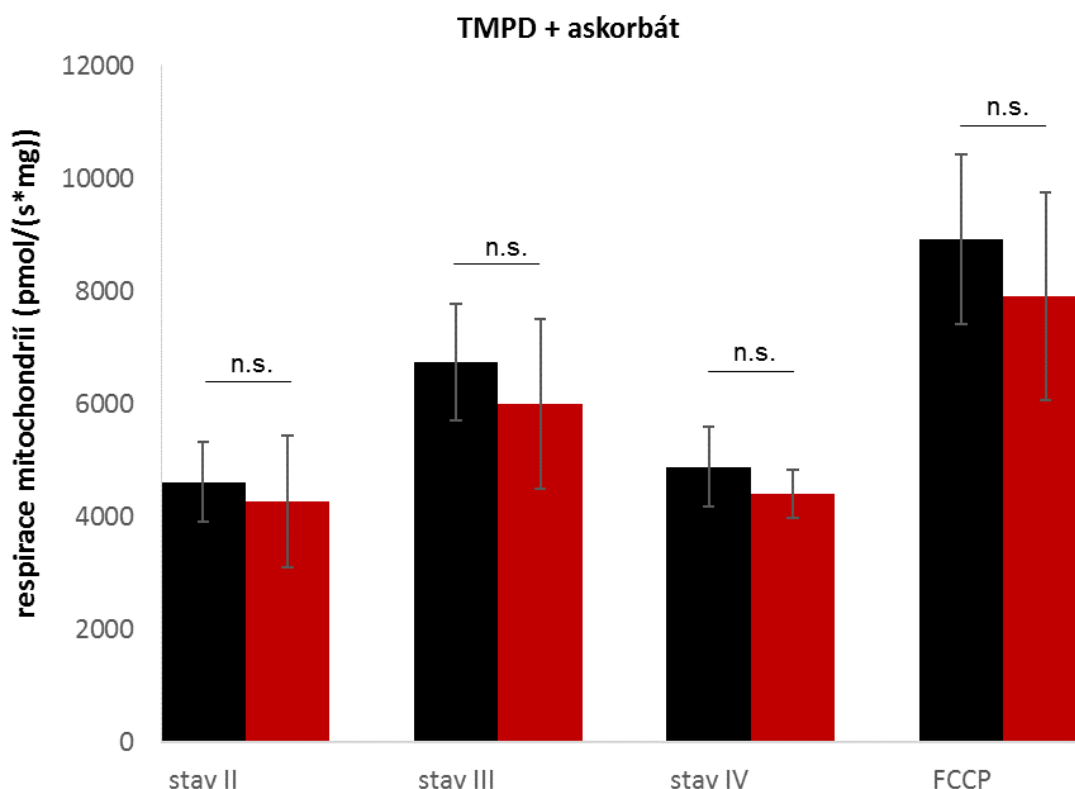
který inhiboval mitochondriální ATP syntázu (stav IV). Průměrné hodnoty stavu IV byly $4889,3 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro wt a $4409,3 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie. Elektrochemický gradient byl poté zredukován přidáním FCCP, čímž byla měřena maximální kapacita dýchacího řetězce. Průměrné hodnoty maximální kapacity dýchacího řetězce činily $8914,6 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro wt a $7903,3 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ pro IF1-KO mitochondrie.

Po použití TMPD jakožto substrátu byl pozorován nižší rozdíl v respiraci izolovaných jaterních mitochondrií IF1-KO myší a WT myší, který nebyl statisticky signifikantní, viz *graf 13*.



Graf 12 – Reprezentativní graf zobrazující průběh respirace izolovaných jaterních mitochondrií ($\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$), po přidání TMPD (redukováného

askorbátem). Dále byly přidávány látky v pořadí a koncentracích, jak je uvedeno v grafu. Význam jednotlivých respiračních stavů je vysvětlen v textu. Černá křivka zobrazuje respiraci WT mitochondrií, zatímco červená křivka zobrazuje respiraci IF1-KO mitochondrií.



Graf 13 – Průměrná respirace mitochondrií (pmol/(s*mg)), za použití substrátu TMPD (redukovaný askorbátem). Černé sloupce zobrazují respiraci WT mitochondrií, zatímco červené sloupce zobrazují respiraci IF1-KO mitochondrií. Význam jednotlivých respiračních stavů je vysvětlen v textu. Pro porovnání dvou skupin byl použit studentův t-test, p-hodnoty jsou označeny následovně: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Lze tedy shrnout, že mitochondrie jaterní tkáně z celotělových IF1 knockout myší vykazovaly nižší spotřebu kyslíku, oproti mitochondriím z wild type myší, s většinou studovaných substrátů, jak je vidět v grafech 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 a 13.

6 DISKUZE

Regulace aktivity mitochondriální ATP syntázy je jedním z klíčových procesů energetického metabolismu. Tato práce se primárně zabývá proteinem IF1, který je známý jako inhibitor ATP syntázy při stavech hypoxie, nebo hladovění, při kterých dochází k poklesu elektrochemického gradientu a hydrolyze ATP. Výsledky studií některých laboratoří však nasvědčují tomu, že v případě IF1 se jedná o fyziologický inhibitor, který kromě hydrolytické aktivity ATP syntázy, inhibuje i syntetickou aktivitu ATP syntázy. Důležitý je rovněž fakt, že IF1 se k ATP syntáze váže pouze v defosforylované formě. Pokud je IF1 fosforylován PKA na Ser-39, stává se neaktivním. Studium mechanismu regulace ATP syntázy proteinem IF1 je aktuálním tématem, které si získává svoji pozornost. Aktuální teoretické poznatky jsou shrnuty v první části této diplomové práce.

Praktická část diplomové práce navazuje na předchozí výsledky naší laboratoře a další provedené studie jiných zahraničních laboratoří, zabývající se mechanismy regulace ATP syntázy proteinem IF1 (García-bermúdez and Cuezva, 2016*; Kahancová et al., 2020, 2018). Bylo publikováno, že hladiny IF1 nejsou konstantní a liší se podle podmínek okolního prostředí, které jsou dané například fyziologickými nároky (García-Bermúdez et al., 2015). Rovněž se množství proteinu IF1 liší podle typu tkáně, což bylo studováno především v souvislosti s rakovinným onemocněním (María Sánchez-Aragó et al., 2013a, Esparza-Moltó et al., 2018*). Předchozí výsledky naší laboratoře, zabývající se funkcí proteinu IF1 v pankreatických β -buňkách ukazují, že IF1 ovlivňuje jejich energetický metabolismus a výlev inzulinu (Kahancová et al., 2018). Zajímalo nás tedy, jestli se hladiny proteinu IF1 liší v závislosti na dostupnosti živin. Podle výsledků této práce se exprese proteinu IF1 snižuje se zvýšenou koncentrací glukózy. Hladiny podjednotky α -ATP syntázy zůstávali za různých kultivačních podmínek konstantní. Z výsledků je tedy zřejmé, že hladiny proteinu IF1 nejsou v pankreatických β -buňkách konstantní a liší se podle dostupnosti substrátu (tyto výsledky byly použity v publikaci Kahancová et al., 2020). Tyto výsledky tak podporují funkci IF1 jakožto aktivního regulátoru buněčného metabolismu pankreatických β -buněk. Také podporují hypotézu, že IF1 reguluje aktivitu ATP syntázy za fyziologických, a nejen patofyziologických

podmínek. Je možné, že zvýšení exprese proteinu IF1 při nízkých koncentracích glukózy lze vysvětlit zvýšenými nároky na hospodaření s buněčným ATP.

V další části se práce zabývá otázkou, zda je protein IF1 cílem post-translačních modifikací v pankreatických β -buňkách. Post-translační modifikace IF1 byly studovány metodou separační proteinové 2D elektroforézy. V souladu s výsledky z jiné laboratoře 2D elektroforéza potvrdila výskyt více forem IF1, s pI 7,7; 8,3 a 9 (García-Bermúdez et al., 2015). Na základě předchozích studií se lze domnívat, že se jedná především o fosforylace pomocí PKA, avšak pro finální potvrzení bude zapotřebí dalších experimentů, například hmotnostní spektrometrie (García-Bermúdez et al., 2015). Za předpokladu že se jedná o fosforylace, zdá se, že v pankreatických β -buňkách převažuje neaktivní fosforylovaný protein IF1, nad aktivním defosforylovaným. Neaktivní fosforylovaná frakce IF1 v buňkách by mohla sloužit jako záloha pro stresové stavy, při kterých je nutné rychle reagovat na změny v energetickém metabolismu.

Velice důležitý je pro buňku cytosolický poměr ATP/ADP. V této práci byl pro studium poměru ATP/ADP použit biosenzor PercevalHR, díky kterému bylo možné sledovat rozdíly v poměru ATP/ADP v tkáňové kultuře INS-1E, se zvýšenou expresí proteinu IF1. Poměr ATP/ADP je klíčový pro uzavírání K_{ATP} kanálu a následný výlev inzulinu (Kahancová et al., 2020, 2018). Výsledky těchto experimentů tedy mohou pomoci k objasnění funkce IF1, ve vztahu k výlevu inzulinu pankreatickými β -buňkami.

Z předchozích výsledků naší laboratoře je zřejmé, že dibutyryl-cAMP aktivuje PKA a ruší tak efekt zvýšené exprese proteinu IF1, na koncentraci buněčného ATP (Kahancová et al., 2020). Proto nás zajímalo, zda podobného efektu lze docílit s použitím GLP-1R agonisty, který by podle jiných studií měl také aktivovat PKA (Bao et al., 2015). V této diplomové práci nicméně nebylo pozorováno, že by měl GLP-1R agonista stejné účinky jako dibutyryl-cAMP. Avšak aby mohla být s jistotou vyvrácena hypotéza, že GLP-1R agonista deaktivuje inhibiční aktivitu IF1, bude třeba dalších studií, například použití

jiných koncentrací GLP-1R agonisty, nebo regulovat aktivitu GLP-1 receptoru jiným způsobem, za použití jiného receptorového agonisty, nebo antagonisty.

V poslední části se práce zabývá in vitro experimenty měření respirace na izolovaných mitochondriích jaterní tkáně celotělových IF1-KO myší. V tomto ohledu jsou výsledky práce ojedinělé, jelikož nebyla doposud studována respirace mitochondrií izolovaných z IF1-KO myší. Měření respirace izolovaných mitochondrií je považováno za jeden ze základních bioenergetických experimentů, který může přispět k odhalení změn ve funkci respiračního řetězce. Experimenty byly prováděny pomocí vysokorezoluční respirometrie, na zařízení oxygraf-2k. Výsledky měření poukazují na sníženou hodnotu respirace u IF1-KO myší ve stavu III a také v odpřaženém stavu, oproti kontrolní *wild type* skupině. Tyto rozdíly byly pozorovány jak se substrátem pro komplex I, glutamátem a malátem, tak i se substrátem pro komplex II, sukcinátem (v přítomnosti inhibitoru komplexu I, rotenonu). Pakliže byly elektrony do respiračního řetězce dodávány uměle, redukcí cytochromu c pomocí látky TMPD, byly pozorovány menší rozdíly, které nebyly statisticky signifikantní. To že změny byly pozorované také v přítomnosti odpřahovače FCCP naznačuje, že u IF1-KO došlo ke komplexní změně v aktivitě dýchacího řetězce, která by mohla být způsobná například sníženým množstvím komplexů respiračního řetězce, nebo tím, že IF1 nepřímo tlumí aktivitu komplexu IV, tím že brání jeho uspořádání do superkomplexů (Formentini et al., 2014; Santacatterina et al., 2016). Zřejmě se tedy jedná o adaptační mechanismus, který je nutný k udržení bioenergetické rovnováhy, v absenci proteinu IF1.

7 ZÁVĚR

Tato práce měla za cíl shrnout aktuální poznatky o mechanismu inhibice ATP syntázy proteinem IF1 a prohloubit tyto znalosti.

- Exprese proteinu IF1 není v pankreatických β -buňkách konstantní a liší se podle dostupnosti substrátu. Z toho lze vyvodit, že IF1 se aktivně podílí na regulaci metabolismu pankreatických β -buněk. Tyto výsledky také potvrzují, že IF1 reguluje ATP syntázu aktivně za fyziologických podmínek, a ne pouze za patofyziologických, jak bylo uváděno dříve.
- Pomocí 2D elektroforézy bylo potvrzeno, že protein IF1 v pankreatických β -buňkách je cílem post-translačních modifikací. Bude vhodné provést další studie, které objasní, o jaké modifikace se jedná, neboť se může jednat o zásadní mechanismy regulující aktivitu IF1.
- Pankreatické β -buňky se zvýšenou expresí nativního IF1, mají nižší poměr ATP/ADP, oproti kontrolním pankreatickým β -buňkám. Tento poměr je důležitý především při uzavírání K_{ATP} kanálu a následné sekreci inzulinu. Tyto výsledky mohou dopomoci k objasnění spojitostí funkce proteinu IF1 s dalšími metabolickými procesy pankreatických β -buněk, jako je zmíněný výlev inzulinu.
- Za podmínek použitých v této práci nebyly pozorovány účinky GLP-1R agonisty na koncentraci buněčného ATP, v pankreatických β -buňkách se zvýšenou expresí proteinu IF1 a kontrolních buňkách.
- Izolované jaterní mitochondrie IF1-KO myši vykazovaly sníženou hodnotu respirace, oproti *wild type* jaterním mitochondriím. Největší rozdíly byly zaznamenány v respiračním stavu III, a při odpřažení respiračního řetězce pomocí FCCP. Vzhledem k tomu, že byly změny pozorovány i v přítomnosti odpřahovače FCCP, lze se domnívat, že u IF1-KO došlo ke komplexní změně v aktivitě dýchacího řetězce, která by mohla být způsobná například nižším množstvím komplexů respiračního řetězce. Zřejmě se jedná o jeden z adaptačních mechanismů, kompenzující nepřítomnost proteinu IF1.

8 LITERATURA

1. Acin-Perez, R., Gatti, D.L., Bai, Y., Manfredi, G., 2011. Protein Phosphorylation and Prevention of Cytochrome Oxidase Inhibition by ATP: Coupled Mechanisms of Energy Metabolism Regulation. *Cell Metab.* 13, 712–719. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.024>
2. Acin-Perez, R., Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J., Levin, L.R., Manfredi, G., 2009. Cyclic AMP Produced inside Mitochondria Regulates Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab.* 9, 265–276. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.01.012>
3. Bao Y, Jiang L, Chen H, Zou J, Liu Z, Shi Y: The Neuroprotective Effect of Liraglutide is Mediated by Glucagon-Like Peptide 1 Receptor-Mediated Activation of cAMP/PKA/CREB Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2015;36:2366-2378. doi: 10.1159/000430199
4. Benedetto, G. Di, Pendin, D., Greotti, E., Pizzo, P., Pozzan, T., 2014. Ca²⁺ and cAMP cross-talk in mitochondria 2, 305–312. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.259135>
5. Benedetto, G. Di, Scalzotto, E., Mongillo, M., Pozzan, T., 2013. Article Mitochondrial Ca²⁺ Uptake Induces Cyclic AMP Generation in the Matrix and Modulates Organelle ATP Levels. *Cell Metab.* 17, 965–975. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.003>
6. *Brenner C, Grimm S. (2006). The permeability transition pore complex and cancer cell death. *Oncogene* 25: 4744–4756.
7. Brenner, C., Subramaniam, K., Pertuiset, C., Pervaiz, S., 2011. Adenine nucleotide translocase family: Four isoforms for apoptosis modulation in cancer. *Oncogene* 30, 883–895. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.501>
8. Cabezón, E., Arechaga, I., Butler, P.J.G., Walker, J.E., 2000. Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1. *J. Biol. Chem.* 275, 28353–28355. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000427200>
9. Cabezón, E., Montgomery, M., Leslie, A. et al. The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat Struct Mol Biol* 10, 744–750 (2003). <https://doi.org/10.1038/nsb966>
10. Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M.R., Abramov, A.Y., Tinker, A., Duchen, M.R., 2008. Regulation of Mitochondrial Structure and Function by the F1Fo-ATPase Inhibitor Protein, IF1. *Cell Metab.* 8, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.001>
11. *Campanella, M., Parker, N., Tan, C.H., Hall, A.M., Duchen, M.R., 2009. IF1: setting the pace of the F1Fo-ATP synthase. *Trends Biochem. Sci.* 34, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.03.006>
12. *Carlucci, A., Lignitto, L., Feliciello, A., 2008. Control of mitochondria dynamics and

- oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome. *Trends Cell Biol.* 18, 604–613. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.09.006>
13. Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., Perales-Clemente, E., Salviati, L., Fernandez-Silva, P., Enriquez, J.A., Scorrano, L., 2013. Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency. *Cell* 155, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.032>
 14. Corso, M., Thomson, M., 2001. Protein Phosphorylation in Mitochondria from Human Placenta. *Placenta* 22, 432–439. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0672>
 15. Cribbs, J.T., Strack, S., 2007. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* 8, 939–944. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401062>
 16. *Cuezva, J.M., Ortega, Á.D., Willers, I., Sánchez-Cenizo, L., Aldea, M., Sánchez-Aragó, M., 2009. The tumor suppressor function of mitochondria: Translation into the clinics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1792, 1145–1158. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.01.006>
 17. Dagda, R.K., Gusdon, A.M., Pien, I., Strack, S., Green, S., Li, C., Van Houten, B., Cherra, S.J., Chu, C.T., 2011. Mitochondrially localized PKA reverses mitochondrial pathology and dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease. *Cell Death Differ.* 18, 1914–1923. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.74>
 18. Daikoku, T., Shinohara, Y., Shima, A., Yamazaki, N., Terada, H., 2000. Specific elevation of transcript levels of particular protein subtypes induced in brown adipose tissue by cold exposure. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* 1457, 263–272. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00107-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00107-9)
 19. *De Stefani, D., Rizzuto, R., Pozzan, T., 2016. Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 161–192. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034216>
 20. Dickey, A.S., Strack, S., 2011. PKA/AKAP1 and PP2A/B β 2 Regulate Neuronal Morphogenesis via Drp1 Phosphorylation and Mitochondrial Bioenergetics. *J. Neurosci.* 31, 15716 LP – 15726. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3159-11.2011>
 21. Ding, X., Kong, J., Xu, W., Dong, S., Du, Y., Yao, C., Gao, J., Ke, S., Wang, S., Sun, W., 2018. Atpase inhibitory factor 1 inhibition improves the antitumor of YC-1 against hepatocellular carcinoma. *Oncol. Lett.* 16, 5230–5236. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9266>
 22. Dohi, T., Xia, F., Altieri, D.C., 2007. Compartmentalized Phosphorylation of IAP by Protein Kinase A Regulates Cytoprotection. *Mol. Cell* 27, 17–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.004>

23. *Duchen, M.R., 2004. Roles of Mitochondria in Health and Disease. *Diabetes* 53, S96 LP-S102. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.S96>
24. *Dvořáková, M., Příbylová, M., Vaněk, T., 2013. Sirtuiny-Histonové deacetylasy ovlivňující transkripci genů. *Chem. List.* 107, 537–544. ISSN 1213-7103
25. Dyson, M.T., Kowalewski, M.P., Manna, P.R., Stocco, D.M., 2009. The differential regulation of steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis by type I and type II PKA in MA-10 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 300, 94–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.11.029>
26. *Esparza-Moltó, P.B., Cuezva, J.M., 2018. The Role of mitochondrial H⁺-ATP synthase in cancer. *Front. Oncol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00053>
27. *Esparza-Moltó, P.B., Nuevo-Tapióles, C., Cuezva, J.M., 2017. Regulation of the H⁺-ATP synthase by IF1: a role in mitohormesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2151–2166. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2462-8>
28. Esparza-Moltó, P.B., Nuevo-Tapióles, C., Chamorro, M., Nájera, L., Torresano, L., Santacatterina, F., Cuezva, J.M., 2019. Tissue-specific expression and post-transcriptional regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) in human and mouse tissues. *FASEB J.* 33, 1836–1851. <https://doi.org/10.1096/fj.201800756R>
29. Faccenda, D., Nakamura, J., Gorini, G., Dhoot, G.K., Piacentini, M., Yoshida, M., Campanella, M., 2017. Control of Mitochondrial Remodeling by the ATPase Inhibitory Factor 1 Unveils a Pro-survival Relay via OPA1. *Cell Rep.* 18, 1869–1883. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.070>
30. Faure Vigny H, Heddi A, Giraud S, Chautard D, Stepien G. (1996). Expression of oxidative phosphorylation genes in renal tumors and tumoral cell lines. *Mol Carcinog* 16: 165–172.
31. Fedorenko, A., Lishko, P. V, Kirichok, Y., 2012. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* 151, 400–413. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.010>
32. Folmes, C.D.L., Nelson, T.J., Martinez-Fernandez, A., Arrell, D.K., Lindor, J.Z., Dzeja, P.P., Ikeda, Y., Perez-Terzic, C., Terzic, A., 2011. Somatic Oxidative Bioenergetics Transitions into Pluripotency-Dependent Glycolysis to Facilitate Nuclear Reprogramming. *Cell Metab.* 14, 264–271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.011>
33. Formentini, L., Pereira, M.P., Sánchez-Cenizo, L., Santacatterina, F., Lucas, J.J., Navarro, C., Martínez-Serrano, A., Cuezva, J.M., 2014.; In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *EMBO J.* 33, 762 LP – 778.
34. Formentini, L., Sánchez-Aragó, M., Sánchez-Cenizo, L., Cuezva, J.M., 2012. The

- Mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 Triggers a ROS-Mediated Retrograde Prosurvival and Proliferative Response. *Mol. Cell* 45, 731–742. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.008>
35. *García-bermúdez, J., Cuezva, J.M., 2016. Biochimica et Biophysica Acta The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. *BBA-Bioenerg.* 1857, 1167–1182. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2016.02.004>
 36. García-Bermúdez, J., Sánchez-Aragó, M., Soldevilla, B., del Arco, A., Nuevo-Tapióles, C., Cuezva, J.M., 2015. PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H⁺-ATP Synthase. *Cell Rep.* 12, 2143–2155. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.052>
 37. Glancy, B., Hartnell, L.M., Malide, D., Yu, Z.-X., Combs, C.A., Connelly, P.S., Subramaniam, S., Balaban, R.S., 2015. Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle. *Nature* 523, 617–620. <https://doi.org/10.1038/nature14614>
 38. Gomes, L.C., Benedetto, G. Di, Scorrano, L., 2011. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* 13, 589–598. <https://doi.org/10.1038/ncb2220>
 39. He, J., Ford, H.C., Carroll, J., Douglas, C., Gonzales, E., Ding, S., Fearnley, I.M., Walker, J.E., 2018. Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 201722086. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722086115>
 40. Chen, C.-T., Shih, Y.-R. V, Kuo, T.K., Lee, O.K., Wei, Y.-H., 2008. Coordinated Changes of Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Enzymes During Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 26, 960–968. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0509>
 41. Ilouz, R., Bubis, J., Wu, J., Young, Y., Deal, M.S., Kornev, A.P., Ma, Y., 2012. Localization and quaternary structure of the PKA RI β holoenzyme. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209538109>
 42. Jacobsson, A., Cannon, B., Nedergaard, J., 1987. Physiological activation of brown adipose tissue destabilizes thermogenin mRNA. *FEBS Lett.* 224, 353–356. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80483-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80483-0)
 43. Jensen, R.E., Aiken Hobbs, A.E., Cervený, K.L., Sesaki, H., 2000. Yeast mitochondrial dynamics: Fusion, division, segregation, and shape. *Microsc. Res. Tech.* 51, 573–583. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20001215\)51:6<573::AID-JEMT7>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20001215)51:6<573::AID-JEMT7>3.0.CO;2-2)
 44. Jensen TE, Wojtaszewski JF, Richter EA. AMP-activated protein kinase in contraction regulation of skeletal muscle metabolism: necessary and/or sufficient?. *Acta Physiol (Oxf).* 2009;196(1):155-174. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01979.x
 45. Kahancová, A., Sklenář, F., Ježek, P., Dlasková, A., 2020. Overexpression of native

- IF1 downregulates glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic INS-1E cells. *Sci. Rep.* 10, 1551. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58411-x>
46. Kahancová, A., Sklenář, F., Ježek, P., Dlasková, A., Dlasková, C.A., 2018. Regulation of glucose-stimulated insulin secretion by ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1). *FEBS Lett.* <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12991>
 47. *Kamp, T.J., Hell, J.W., 2000. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ. Res.* 87, 1095–1102. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.12.1095>
 48. Kim, H., Scimia, M.C., Wilkinson, D., Trelles, R.D., Wood, M.R., Bowtell, D., Dillin, A., Mercola, M., Ronai, Z.A., 2011. Fine-Tuning of Drp1/Fis1 Availability by AKAP121/Siah2 Regulates Mitochondrial Adaptation to Hypoxia. *Mol. Cell* 44, 532–544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.045>
 49. Kleitke, B., Sydow, H., Wollenberger, A., 1976. Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase activity in isolated guinea pig and rat liver mitochondria. *Acta Biol. Med. Ger.* 35, K9–K17. PMID: 184629.
 50. Kostic, M., Ludtmann, M.H.R., Bading, H., Chu, C.T., Abramov, A.Y., Sekler, I., Kostic, M., Ludtmann, M.H.R., Bading, H., Hershfinkel, M., Steer, E., Chu, C.T., 2015. Article PKA Phosphorylation of NCLX Reverses Mitochondrial Calcium Overload and Depolarization, Promoting Survival of PINK1-Deficient Dopaminergic Article PKA Phosphorylation of NCLX Reverses Mitochondrial Calcium Overload and Depolarization, Promoting. *CellReports* 13, 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.079>
 51. Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E.A., Trempe, J.-F., Saeki, Y., Tanaka, K., Matsuda, N., 2014. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510, 162–166. <https://doi.org/10.1038/nature13392>
 52. Lee, H.J., Moon, J., Chung, I., Chung, J.H., Park, C., Lee, J.O., Han, J.A., Kang, M.J., Yoo, E.H., Kwak, S., Jo, G., Park, W., Park, J., Kim, K.M., Lim, S., Ngoei, K.R.W., Ling, N.X.Y., Oakhill, J.S., Galic, S., Murray-segal, L., Kemp, B.E., Mantzoros, C.S., Krauss, R.M., Shin, M., Kim, H.S., 2019. ATP synthase inhibitory factor 1 (IF1), a novel myokine, regulates glucose metabolism by AMPK and Akt dual pathways 1. <https://doi.org/10.1096/fj.201901440RR>
 53. Lefebvre, V., Du, Q., Baird, S., Ng, A.C.-H., Nascimento, M., Campanella, M., McBride, H.M., Screaton, R.A., 2013. Genome-wide RNAi screen identifies ATPase inhibitory factor 1 (ATPIF1) as essential for PARK2 recruitment and mitophagy. *Autophagy* 9, 1770–1779. <https://doi.org/10.4161/auto.25413>
 54. Lefkimmiatis, K., Zaccolo, M., 2014. cAMP signaling in subcellular compartments.

55. LEITNER, JW., KARL E. SUSSMAN, ALBERT E. VATTER, F. HOWARD SCHNEIDER, Adenine Nucleotides in the Secretory Granule Fraction of Rat Islets, *Endocrinology*, Volume 96, Issue 3, 1 March 1975, Pages 662–677, <https://doi.org/10.1210/endo-96-3-662>
56. Llopis, J., McCaffery, J.M., Miyawaki, A., Farquhar, M.G., Tsien, R.Y., 1998. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6803–6808. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6803>
57. Lombard, D.B., Alt, F.W., Cheng, H.-L., Bunkenborg, J., Streeper, R.S., Mostoslavsky, R., Kim, J., Yancopoulos, G., Valenzuela, D., Murphy, A., Yang, Y., Chen, Y., Hirschey, M.D., Bronson, R.T., Haigis, M., Guarente, L.P., Farese, R. V., Weissman, S., Verdin, E., Schwer, B., 2007. Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8807–8814. <https://doi.org/10.1128/MCB.01636-07>
58. *Lunt, S.Y., Vander Heiden, M.G., 2011. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
59. Maria, A., Signorile, A., Nuzzi, R., Rasmo, D. De, Technikova-dobrova, Z., Drahota, Z., Occhiello, A., Pica, A., Papa, S., 2006. Occurrence of A-kinase anchor protein and associated cAMP-dependent protein kinase in the inner compartment of mammalian mitochondria 580, 5690–5696. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.020>
60. Martin, Gregory M et al. “Pharmacological rescue of trafficking-impaired ATP-sensitive potassium channels.” *Frontiers in physiology* vol. 4 386. 24 Dec. 2013, doi:10.3389/fphys.2013.00386
61. Means, C.K., Lygren, B., Langeberg, L.K., Jain, A., Dixon, R.E., Vega, A.L., Gold, M.G., Petrosyan, S., Taylor, S.S., Murphy, A.N., Ha, T., Santana, L.F., Tasken, K., Scott, J.D., 2011. An entirely specific type I A-kinase anchoring protein that can sequester two molecules of protein kinase A at mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E1227 LP-E1235. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107182108>
62. Metelkin, E., Goryanin, I., Demin, O., 2006. Mathematical Modeling of Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocase. *Biophys. J.* 90, 423–432. <https://doi.org/https://doi.org/10.1529/biophysj.105.061986>
63. Mourier, A., Ruzzenente, B., Brandt, T., Ku, W., 2014. Loss of LRPPRC causes ATP synthase deficiency 23, 2580–2592. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt652>
64. Nakamura, J., Fujikawa, M., & Yoshida, M. (2013). IF1, a natural inhibitor of

- mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. *Bioscience reports*, 33(5), e00067. <https://doi.org/10.1042/BSR20130078>
65. Page, E., McCallister, L.P., 1973. Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts. *Am. J. Cardiol.* 31, 172–181. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(73\)91030-8](https://doi.org/10.1016/0002-9149(73)91030-8)
 66. Pagnozzi, D., Birolo, L., Leo, G., Contessi, S., Lippe, G., Pucci, P., Mavelli, I., 2010. Stoichiometry and topology of the complex of the endogenous ATP synthase inhibitor protein IF1 with calmodulin. *Biochemistry* 49, 7542–7552. <https://doi.org/10.1021/bi100447t>
 67. Palorini, R., Rasmø, D. De, Gaviraghi, M., Danna, L.S., Signorile, A., Cirulli, C., Chiaradonna, F., Alberghina, L., Papa, S., 2013. Oncogenic K-ras expression is associated with derangement of the cAMP / PKA pathway and forskolin-reversible alterations of mitochondrial dynamics and respiration. *Oncogene* 352–362. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.50>
 68. Park, J., Chen, Y., Tishkoff, D.X., Peng, C., Tan, M., Dai, L., Xie, Z., Zhang, Y., Zwaans, B.M.M., Skinner, M.E., Lombard, D.B., Zhao, Y., 2013. SIRT5-Mediated Lysine Desuccinylation Impacts Diverse Metabolic Pathways. *Mol. Cell* 50, 919–930. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.06.001>
 69. Prasai, K., 2017. Regulation of mitochondrial structure and function by protein import: A current review, *Pathophysiology*. Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.03.001>
 70. Rehman, J., 2010. Empowering self-renewal and differentiation: the role of mitochondria in stem cells. *J. Mol. Med.* 88, 981–986. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0678-2>
 71. Rich, P.R., Maréchal, A., 2010. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem.* 47, 1–23. <https://doi.org/10.1042/bse0470001>
 72. Rouslin, W., Broge, C.W., 1992. Why the Mitochondrial ATPase Inhibitor IF1 Fails to Inhibit the Mitochondrial ATPase in Situ in Fast Heart-Rate Mammalian and Avian Heartsa. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 671, 505–506. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb43842.x>
 73. Rouslin, W., Broge, C.W., 1993. Mechanisms of ATP conservation during ischemia in slow and fast heart rate hearts. *Am. J. Physiol.* 264, C209–16. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.1.C209>
 74. Rouslin, W., Broge, C.W., Grupp, I.L., 1990. ATP depletion and mitochondrial functional loss during ischemia in slow and fast heart-rate hearts. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 259, H1759–H1766. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.6.H1759>
 75. Ruipeng, S., Huiwen, S., Yingjian, L., Dalong, Y., Heng, Z., Tongsen, Z., Jiabei, W.,

- Zhaoyang, L., Xuan, S., Tiemin, P., Youyou, Q., Yuejin, L., Changming, X., Boshi, S., Huawen, S., Shuai, L., Xianzhi, M., Guangchao, Y., Shangha, P., Jiyuan, Z., Shuyi, Q., Hongchi, J., Zhiyong, Z., Lianxin, L., 2014. Reciprocal activation between ATPase inhibitory factor 1 and NF- κ B drives hepatocellular carcinoma angiogenesis and metastasis. *Hepatology* 60, 1659–1673. <https://doi.org/10.1002/hep.27312>
76. Sánchez-Aragó, M., Formentini, L., Martínez-Reyes, I., García-Bermudez, J., Santacatterina, F., Sánchez-Cenizo, L., Willers, I.M., Aldea, M., Nájera, L., Juarránz, Á., López, E.C., Clofent, J., Navarro, C., Espinosa, E., Cuezva, J.M., 2013. Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Oncogenesis* 2. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.9>
 77. Sánchez-Aragó, M., García-Bermúdez, J., Martínez-Reyes, I., Santacatterina, F., Cuezva, J.M., 2013. Degradation of IF1 controls energy metabolism during osteogenic differentiation of stem cells. *EMBO Rep.* 14, 638–644. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.72>
 78. Sánchez-Cenizo, L., Formentini, L., Aldea, M., Ortega, Á.D., García-Huerta, P., Sánchez-Aragó, M., Cuezva, J.M., 2010. Up-regulation of the ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a warburg phenotype. *J. Biol. Chem.* 285, 25308–25313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.146480>
 79. Santacatterina, F., Chamorro, M., de Arenas, C.N., Navarro, C., Martín, M.A., Cuezva, J.M., Sánchez-Aragó, M., 2015. Quantitative analysis of proteins of metabolism by reverse phase protein microarrays identifies potential biomarkers of rare neuromuscular diseases. *J. Transl. Med.* 13, 65. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0424-1>
 80. Santacatterina, F., Sanchez-Cenizo, L., Formentini, L., Mobasher, M.A., Casas, E., Rueda, C.B., Martinez-Reyes, I., Nunez de Arenas, C., Garcia-Bermudez, J., Zapata, J.M., Sanchez-Arago, M., Satrustegui, J., Valverde, A.M., Cuezva, J.M., 2016. Down-regulation of oxidative phosphorylation in the liver by expression of the ATPase inhibitory factor 1 induces a tumor-promoter metabolic state. *Oncotet* 7, 490–508. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6357>
 81. Santamaría, G., Martínez-Diez, M., Fabregat, I., Cuezva, J.M., 2006. Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* 27, 925–935. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi315>
 82. Sasarman, F., Brunel-guitton, C., Antonicka, H., Wai, T., Shoubridge, E.A., Consortium, L., 2010. LRPPRC and SLIRP Interact in a Ribonucleoprotein Complex That Regulates Posttranscriptional Gene Expression in Mitochondria 21, 1315–1323. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10>

83. Sastri, M., Haushalter, K.J., Panneerselvam, M., Chang, P., Fridolfsson, H., Finley, J.C., Ng, D., Schilling, J.M., Miyanohara, A., Day, M.E., Hakoziaki, H., Petrosyan, S., Koller, A., King, C.C., Darshi, M., Blumenthal, D.K., Ali, S.S., Roth, D.M., Patel, H.H., Taylor, S.S., 2013. A kinase interacting protein (AKIP1) is a key regulator of cardiac stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E387 LP-E396. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221670110>
84. Sebens Mürköster, S., Rausch, A. V., Isberner, A., Minkenberg, J., Blaszczyk, E., Witt, M., Fölsch, U.R., Schmitz, F., Schäfer, H., Arlt, A., 2008. The apoptosis-inducing effect of gastrin on colorectal cancer cells relates to an increased IEX-1 expression mediating NF- κ B inhibition. *Oncogene* 27, 1122–1134. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210728>
85. Shah, D.I., Takahashi-Makise, N., Cooney, J.D., Li, L., Schultz, I.J., Pierce, E.L., Narla, A., Seguin, A., Hattangadi, S.M., Medlock, A.E., Langer, N.B., Dailey, T.A., Hurst, S.N., Faccenda, D., Wiwczar, J.M., Heggors, S.K., Vogin, G., Chen, W., Chen, C., Campagna, D.R., Brugnara, C., Zhou, Y., Ebert, B.L., Danial, N.N., Fleming, M.D., Ward, D.M., Campanella, M., Dailey, H.A., Kaplan, J., Paw, B.H., 2012. Mitochondrial Atpif1 regulates haem synthesis in developing erythroblasts. *Nature* 491, 608–612. <https://doi.org/10.1038/nature11536>
86. Shen, L., Zhi, L., Hu, W., Wu, M.X., 2009. IEX-1 targets mitochondrial F1Fo-ATPase inhibitor for degradation. *Cell Death Differ.* 16, 603–612. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.184>
87. Schnizer, R., Van Heeke, G., Amatur, D., Schuster, S.M., 1996. Histidine-49 is necessary for the pH-dependent transition between active and inactive states of the bovine F1-ATPase inhibitor protein. *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1292, 241–248. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00208-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00208-1)
88. Schrauwen, P., Walder, K., Ravussin, E., 1999. Human uncoupling proteins and obesity. *Obes. Res.* 7, 97–105. <https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1999.tb00396.x>
89. Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R.R., Kühlbrandt, W., 2008. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* 27, 1154–1160. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.35>
90. Sugawara, K., Fujikawa, M., Yoshida, M., 2013. Screening of protein kinase inhibitors and knockdown experiments identified four kinases that affect mitochondrial ATP synthesis activity. *FEBS Lett.* 587, 3843–3847. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.012>
91. Tormos, K.V., Anso, E., Hamanaka, R.B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Chandel, N.S., 2011. Mitochondrial Complex III ROS Regulate Adipocyte Differentiation. *Cell Metab.* 14, 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.007>

92. *Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* (80-.). 324, 1029 LP – 1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
93. Vincent, A.E., White, K., Davey, T., Philips, J., Ogden, R.T., Lawess, C., Warren, C., Hall, M.G., Ng, Y.S., Falkous, G., Holden, T., Deehan, D., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Picard, M., 2019. Quantitative 3D Mapping of the Human Skeletal Muscle Mitochondrial Network. *Cell Rep.* 26, 996-1009.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.010>
94. Walker, J.E., 2013. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1–16. <https://doi.org/10.1042/BST20110773>
95. Warburg, O., 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270. DOI: 10.1126/science.124.3215.267
96. Wei, S., Fukuhara, H., Kawada, C., Kurabayashi, A., Furihata, M., Ogura, S., Inoue, K., Shuin, T., 2015. Silencing of ATPase Inhibitory Factor 1 Inhibits Cell Growth via Cell Cycle Arrest in Bladder Cancer. *Pathobiology* 82, 224–232. <https://doi.org/10.1159/000439027>
97. *Wewege, M.A., Thom, J.M., Rye, K.-A., Parmenter, B.J., 2018. Aerobic, resistance or combined training: A systematic review and meta-analysis of exercise to reduce cardiovascular risk in adults with metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 274, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.002>
98. *Wong, W., Scott, J.D., Jackson, S., Road, P., 2004. AKAP SIGNALLING COMPLEXES: 5. <https://doi.org/10.1038/nrm1527>
99. Yaniv, Y., Juhaszova, M., Lyashkov, A.E., Spurgeon, H.A., Sollott, S.J., Lakatta, E.G., 2011. Journal of Molecular and Cellular Cardiology Ca²⁺ -regulated-cAMP / PKA signaling in cardiac pacemaker cells links ATP supply to demand. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 740–748. <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2011.07.018>
100. Youle, R.J., Narendra, D.P., 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>
101. *Yun, J., Finkel, T., 2014. Mitohormesis. *Cell Metab.* 19, 757–766. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.011>
102. Zhang, J., Guan, Z., Murphy, A.N., Wiley, S.E., Perkins, G.A., Worby, C.A., Engel, J.L., Heacock, P., Nguyen, O.K., Wang, J.H., Raetz, C.R.H., Dowhan, W., Dixon, J.E., 2011. Mitochondrial Phosphatase PTPMT1 Is Essential for Cardiolipin Biosynthesis. *Cell Metab.* 13, 690–700. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.007>

Internetové zdroje

1. StudyLib - 6-Respiratory-chain, <https://studylib.net/doc/5794298/6-respiratory-chain>